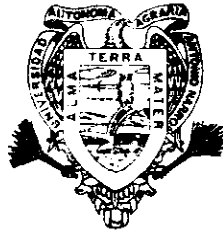


UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
DIVISION DE AGRONOMIA



Relación entre los Parámetros de Producción y el Contenido  
de Proteínas Solubles en Girasol; Caracterización de Patrones  
de Proteínas por Electroforesis

*Por:*

MARTHA ELENA ACOSTA RUIZ

**TESIS**

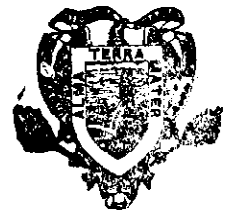
*Presentada como Requisito Parcial para  
Obtener el Título de:*

Universidad Autónoma Agraria  
"ANTONIO NARRO"

*Ingeniero Agrónomo Fitotecnista*

*Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.*

*Junio de 1997*



BIBLIOTECA

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"**

**DIVISION DE AGRONOMIA**

**RELACION ENTRE LOS PARAMETROS DE PRODUCCION Y  
EL CONTENIDO DE PROTEINAS SOLUBLES EN GIRASOL;  
CARACTERIZACION DE PATRONES DE PROTEINAS POR  
ELECTROFORESIS**

**POR**

**MARTHA ELENA ACOSTA RUIZ**

**T E S I S**

**QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACION DEL H. JURADO EXAMINADOR  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA**

**APROBADA**

**EL PRESIDENTE DEL JURADO**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. DIANA JASSO DE RODRIGUEZ**

**SINODAL**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. JORGE ROMERO GARCIA**

**SINODAL**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. ARCENIO BENITEZ GARCIA**  
"ANTONIO NARRO"

  
\_\_\_\_\_  
**COORDINADOR DE LA DIVISION DE AGRONOMIA**

**M.C. MARIANO FLORES DÁVILA**



**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MEXICO.**

Coordinación

**JUNIO 1997**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios**

**Por haberme dado la Vida, la Fé y guiarme por el sendero de la superación, hasta el final de mi carrera.**

**A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**

**Por darme la oportunidad de formarme profesionalmente.**

**A la Dra. Diana Jasso de Rodríguez**

**Por darme la oportunidad de realizar este trabajo, ya que es muy importante para concluir mi carrera ,por el interés mostrado, el apoyo y la asesoría en todo momento. En especial por su ejemplo y su confianza.**

**Al Dr. Jorge Romero, por su valioso apoyo en todo momento para concluir el presente trabajo de investigación.**

**Al Dr. Raúl Rodríguez García, por el tiempo y el interés mostrado para la realización del presente trabajo.**

**Al personal del laboratorio de Fitoquímica, por haber contribuido en este trabajo, y por la amistad brindada.**

**Al personal de laboratorio de Biopolimeros del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), por su valiosa ayuda y la amistad brindada.**

## **DEDICATORIAS**

A lo más grande que me ha dado Dios...

Mi padre:

**Sr. HERMILO ACOSTA GUTIÉRREZ**

Por el amor y confianza que siempre me ha dado, por el ejemplo de respeto inculcado a sus hijos y por el apoyo brindado.

Mi madre:

**Sra. FLOR CARITINA RUIZ GARCÍA**

Por el ejemplo de superación, el apoyo y estímulo para salir adelante, gracias por su amor y confianza.

A mis hermanos:

Eliseo

Miriam

Jacqueline

Ulises

Argelia

Erick

Por el cariño, comprensión y apoyo brindado en todo momento.

A Marcos González Reyes:

Por el estímulo, ayuda, comprensión y el cariño que me ha dado.

A mis amigos y compañeros:

Sauly, Aracely, Bertha, Mary, Paty, Miriam, Carmen, Gyna, J. Jesus, José, Adán y Efrain, por su amistad y confianza, gracias.

## INDICE DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
1.1 Objetivos.....	2
II. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1 Aspectos Generales.....	3
2.2 Clasificación botánica.....	4
2.3 Descripción de la planta.....	4
2.4 Producción de materia seca.....	7
2.5 Rendimiento.....	7
2.6 Contenido de aceite y proteína.....	9
2.7 Proteínas solubles.....	10
2.8 Electroforesis en gel.....	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 Localización del área de estudio.....	15
3.2 Material genético utilizado.....	15
3.3 Siembra.....	16
3.4 Labores culturales.....	16
3.5 Fenología del girasol.....	17
3.6 Medidas efectuadas en el curso del ciclo de desarrollo del cultivo del girasol.....	20

3.7 Variables consideradas en el laboratorio.....	20
3.7.1 Peso seco.....	21
3.7.2 Area foliar.....	21
3.7.3 Rendimiento.....	21
3.7.4 Contenido de aceite.....	21
3.7.5 Contenido de proteína cruda.....	22
3.7.6 Determinación de proteínas solubles: foliares y en semilla.....	22
3.7.6.1 Extracción de proteínas.....	22
3.7.6.2 Cuantificación de proteínas de la muestra.....	23
3.7.7 Determinación de los pesos moleculares de las proteínas.....	23
3.7.7.1 Método de electroforesis.....	23
3.7.7.2 Electroforesis de proteínas por el gel dodecil sulfato de sodio (SDS) de poliacrilamida.....	24
3.7.7.3 Vaciado de los geles SDS-poliacrilamida.....	26
3.7.7.4 Preparación de muestras.....	28
3.7.6.5 Marcadores estándar de proteínas.....	28
3.7.7.6 Tinción de los geles SDS-poliacrilamida con azul brillante coomassie.....	29
3.7.7.7 Determinación de pesos moleculares.....	29
3.7.8 Análisis de datos.....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
4.1 Condiciones climáticas.....	31

4.2 Fenología y unidades calor.....	32
4.3 Area foliar e indice de área foliar.....	34
4.4 Producción de materia seca.....	36
4.4.1 Variedad SAN-3C.....	36
4.4.2 Variedad SANE 23578.....	38
4.4.3 Variedad SANE 1278.....	38
4.4.4 Variedad GORDIS.....	38
4.4.5 Variedad RIB 77.....	40
4.4.6 Variedad KLM 123.....	40
4.5 Rendimiento de grano.....	42
4.6 Índice de cosecha.....	44
4.7 Contenido de aceite (%).....	44
4.8 Rendimiento de aceite.....	45
4.9 Rendimiento de proteína cruda.....	46
4.10 Proteínas solubles foliares.....	47
4.11 Proteínas solubles de la semilla.....	49
4.12 Análisis de electroforesis de las proteínas.....	51
V. CONCLUSIONES.....	58
VI. RESUMEN.....	59
VII. BIBLIOGRAFIA.....	62
VIII. APENDICE.....	65

## INDICE DE CUADROS

Cuadro No		Página
3.1	Material genético utilizado en el experimento.....	15
3.2	Fechas de riego y precipitación acumulada a los diferentes estadios...	17
3.3	Estadios observados del girasol durante el ciclo de desarrollo del cultivo en 1996.....	18
3.4	Preparación de gel de desarrollo para electroforesis.....	26
3.5	Preparación de gel de carga para electroforesis.....	26
4.1	Temperaturas y precipitación reportadas para el área de estudio durante el ciclo de desarrollo del cultivo.....	31
4.2	Días que requirieron las diferentes variedades para alcanzar los principales estadios de desarrollo.....	32
4.3	Unidades calor acumuladas (U.C.A.) en los principales estadios de desarrollo del cultivo de girasol.....	34
4.4	Índice de área foliar (I.A.F.) para las variedades en estudio los estadios inicio de floración y fin de floración.....	36
4.5	Valores de índice de cosecha en las variedades de girasol.....	44



## INDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
3.1	Curva de calibración de marcadores de pesos moleculares.....	30
4.1	Evolución del área foliar en seis variedades de girasol durante el ciclo de desarrollo.....	35
4.2	Acumulación de materia seca en Ton/ha de la variedad SAN-3C.....	37
4.3	Acumulación de materia seca en Ton/ha de la variedad SANE 23578.....	37
4.4	Acumulación de materia seca en Ton/ha de la variedad SANE 1278.	39
4.5	Acumulación de materia seca en Ton/ha de la variedad GORDIS.....	39
4.6	Acumulación de materia seca en Ton/ha de la variedad RIB 77.....	41
4.7	Acumulación de materia seca en Ton/ha de la variedad KLM 123.....	41
4.8	Rendimiento de la semilla en Ton/ha de girasol en diferentes variedades.....	43
4.9	Contenido de aceite (%) de las semillas de las variedades de girasol..	45
4.10	Rendimiento de aceite (Ton/ha) de las variedades de girasol.....	46
4.11	Rendimiento de proteína cruda (Ton/ha) de las variedades de girasol.....	47
4.12	Contenido de proteína soluble foliar (mg/grs de hojas/planta) de las variedades de girasol en diferentes estadios.....	50

4.13	Contenido de proteínas solubles (mg/grs de semilla/planta) de las semillas de girasol en diferentes variedades.....	50
4.14	Electroforesis de proteínas solubles foliares en estadio estrella.....	52
4.15	Electroforesis de proteínas solubles foliares en botón floral.....	53
4.16	Electroforesis de proteínas solubles foliares en inicio de floración.....	54
4.17	Electroforesis de proteínas solubles foliares en fin de floración.....	56
4.18	Electroforesis de proteínas solubles de las semillas de girasol.....	57

## I. INTRODUCCIÓN

En el mejoramiento de plantas se debe tener como objetivo permanente el acrecentar los rendimientos y el valor nutricional de las plantas cultivadas.

El fitomejorador tendrá como objetivo (además de la productividad) el mejorar la calidad nutricional y la calidad de utilización; para alcanzar los dos objetivos, él debe poder actuar sobre la composición protéica, a fin de obtener las propiedades favorables de calidad. Las proteínas son, las sustancias claves del mecanismo biológico, porque ellas contienen los ácidos nucleicos que proporcionan la herencia. De ahí la importancia de las proteínas vegetales.

El girasol es una planta oleoproteagínosa que se caracteriza por una actividad fotosintética alta. Esto ocurre particularmente en las plantas jóvenes, comparadas con las plantas de maíz y soya.

El sistema enzimático del girasol es el de una planta C<sub>3</sub>, la asimilación de CO<sub>2</sub> se efectúa gracias a la enzima RUBISCO (Ribulosa-Bifosfato-Carboxilasa-Oxigenasa), de peso molecular elevado (540 KDa), ya que está constituida de 2 subunidades repetidas cada una 8 veces (estructura A<sub>8</sub> y B<sub>8</sub>), esta enzima es la más abundante de las proteínas solubles de las hojas y tiene también un rol catalítico fundamental y además se añade necesariamente un rol de reserva porque, a la senescencia de las hojas, una parte de su carbono y sobre todo del nitrógeno es liberado y puesto a disposición de los órganos de reserva que son en este caso las semillas. Los contenidos de esta enzima en la planta y las actividades específicas están fuertemente correlacionadas a los niveles de fotosíntesis.

Las hojas de los rangos superiores son las que presentan los potenciales fotosintéticos más importantes. Esas hojas son usualmente las más ricas en proteínas solubles.

La acumulación de compuestos nitrogenados tiene lugar esencialmente durante la fase vegetativa, después de la floración el almacenamiento total de nitrógeno varía poco, se observan principalmente redistribuciones; las 2/3 partes del nitrógeno contenido en los granos a maduración proviene de las redistribuciones, principalmente de las hojas. La cinética de acumulación de lípidos es muy diferente, se lleva a cabo al mismo tiempo que el incremento de materia seca en los granos.

Debido a las relaciones de las proteínas con el proceso de fotosíntesis es posible considerar que una variedad con alto contenido de proteína soluble proporcionará mayor rendimiento, ya que las proteínas están relacionadas con el proceso de metabolismo y acumulación de biomasa, asimismo participan en la regulación de la síntesis de aceite.

Por lo anterior en nuestra investigación hemos realizado estudios agronómicos y bioquímicos con los objetivos de:

- 1.- Relacionar los parámetros de producción con el contenido de proteínas solubles.
- 2.- Caracterizar los patrones de proteínas solubles por electroforesis.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos Generales

El girasol es una planta de ciclo anual, herbácea. Pertenece a la familia de las Compuestas y al género *Helianthus*, cuya especie más importante es *Helianthus annuus* L., por dos razones: se cultiva como planta oleaginosa y ornamental, y es la más distribuida geográficamente, pues forman parte de la especie tanto malas hierbas como plantas cultivadas.

Entre las características más importantes del girasol cultivado. Se cita que tiene muy buena resistencia a la sequía, resistencia a bajas temperaturas, y alto porcentaje de aceite. (Robles 1985).

El aceite de girasol tiene excelentes propiedades nutricionales. Este es prácticamente libre de componentes tóxicos significativos y tiene una ligera concentración de ácido linoleico. Este ácido graso poliinsaturado es ácido graso esencial no sintetizado por humanos. (Carter 1978).

Robles (1985), menciona que entre los componentes más importantes del aceite, se encuentra el ácido linoleico con alrededor de 60%, el ácido oleico alrededor de 35%, el ácido palmítico es de 4 a 5%, el ácido esteárico alrededor de 2.5%, de los demás ácidos grasos se encuentran cantidades insignificantes.

## 2.2 Clasificación Botánica

Según Robles (1985), la clasificación botánica del girasol es la siguiente:

Reino	Vegetal
División	Tracheophyta
Sub-División	Pteropsida
Clase	Angiospermas
Sub-Clase	Dicotiledóneas
Orden	Synandreae
Familia	Compositae
Sub-Familia	Tubiflorae
Tribu	Heliantheae
Género	Helianthus
Especie	annuus
Nombre científico	<i>Helianthus annuus</i> L.

## 2.3 Descripción de la planta.

La descripción de las plantas de girasol que se presenta en este trabajo es la descrita por Ortegón (1993).

### RAÍZ

La raíz del girasol es pivotante; se forma por un eje principal dominante y abundantes raíces secundarias. El conjunto forma un fuerte sistema radical que puede alcanzar hasta 4 m de profundidad.

La raíz principal crece con mayor rapidez que la parte aérea al iniciarse el desarrollo de la planta. Normalmente la raíz principal sobrepasa la altura del tallo. La

profundidad a la cual se desarrolla la red de raicillas depende de las condiciones climáticas.

## TALLO

El tallo es erecto, vigoroso y cilíndrico. Tiene el interior macizo. Al llegar a la madurez, se inclina en la parte terminal a consecuencia del peso de la inflorescencia. La superficie exterior es rugosa, asurcada y vellosa. La altura de las variedades aceiteras es entre 60 y 220 cm. El diámetro varía entre 2 y 6 cm, con mayor grosor en la parte inferior del tallo.

## HOJAS

Las hojas son alternas, grandes, trinervadas, muy pecioladas, de formas variables, acuminadas, dentadas, con vellosidad áspera en el haz y envés.

La posición de las hojas en el tallo es la siguiente: en los primeros dos a tres pares son opuestas y los demás son alternas. El número de hojas por planta varía de 12 a 40, según las condiciones del cultivo y las peculiaridades individuales de la variedad.

En función de la fertilidad del suelo, la superficie foliar de una planta madura abarca de 3000 a 6000 cm<sup>2</sup>.

## INFLORESCENCIA

La inflorescencia (llamada capítulo o cabeza) está formada por un número de flores que fluctúa entre 500 a 1500. Su borde se compone de brácteas protectoras que forman un involucre. El conjunto toma la forma de un disco que constituye el receptáculo.

El receptáculo es un disco plano, cóncavo o convexo, el cual tiene insertadas las flores en la cara superior y las brácteas en el borde. En plena floración es semicarnoso y succulento. En el receptáculo hay dos tipos de flores: liguladas y tubuladas. Las flores

liguladas son estériles y se componen de un ovario rudimentario, un cáliz también rudimentario y una corola transformada, semejante a un pétalo. Ellas suman de 30 a 70; están dispuestas radialmente en una o dos filas; tienen una longitud de 6 a 10 cm y una anchura de 2 a 3 cm; son de color amarillo-dorado, amarillo-claro y amarillo-anaranjado. Las flores tubulosas son fértiles, pues llevan los órganos de reproducción; cada una se compone de cáliz, corola, androceo y gineceo; están dispuestas en arcos espirales que parten del exterior hacia el centro de los discos.

## FRUTO

En botánica el fruto de girasol se llama aquenio, el cual es seco, indehiscente y se compone por el pericarpio y la semilla. Comúnmente se denomina “semilla” o “grano”.

Por lo general, la semilla de las variedades aceiteras es negra y tiene aproximadamente un 25% de cáscara. El aquenio mide alrededor de 4 a 6 mm de ancho por 8 a 12 mm de largo. El contenido de aceite oscila entre 40 a 55%, según la variedad y los efectos del ambiente donde se produce la semilla.

Es común que las semillas tengan un tamaño variable según la posición que tengan dentro del capítulo: las grandes se encuentran en la periferia y las más pequeñas en el centro.

Además del aceite, la semilla contiene sustancias proteicas y sustancias extractivas no nitrogenadas, sobre todo hidratos de carbono solubles. Las variedades tienen un contenido de proteína bruta en la semilla que oscila entre el 24 y 35% ( Ermakov, citado por Guerrero. 1977).

En las variedades con un contenido alto en aceite, el aumento del porcentaje de éste en la almendra, está acompañado de la disminución correspondiente de sustancias proteicas.

En el complejo proteico de las semillas de girasol, predominan las albúminas y las globulinas, que forman el 80 a 88% del total de las sustancias proteicas. En función de las particularidades de la variedad y condiciones de cultivo, las albúminas representan del 44 al 49%, y las globulinas del 34 al 41% ( Iares, 1967, citado por Guerrero).



## **2.4 Producción de materia seca.**

En un estudio realizado por San José (1988), las características del crecimiento del girasol, fueron determinadas en tres variedades cultivadas durante la temporada húmeda de un clima de sabana. Los resultados indican que parece existir una dependencia diferencial de la capacidad productiva de los genotipos en función de los factores ambientales, característicos de la época de crecimiento. Las características de crecimiento de los cultivares, basadas en peso seco y área foliar, indican que la tasa de crecimiento del cultivo (TCC), de las variedades fue seguido de patrones similares, la tasa de crecimiento de los cultivares decrece con la edad del cultivo. Los genotipos presentaron un rango similar de crecimiento a iguales intervalos de tiempo.

La distribución de peso seco en los diferentes órganos de las plantas fue similar entre los cultivares. En la máxima acumulación de biomasa, los asimilatos fueron desviados a hojas, pecíolos, tallos, raíces e inflorescencia.

Jaafar (1993), examinó el desarrollo de las plantas de girasol, con énfasis en profundidad de raíces bajo condiciones de campo, para el desarrollo de un modelo para estimar el uso de agua del cultivo y requerimientos de irrigación. Los análisis de regresión fueron aplicados a los datos sobre crecimiento de raíz y desarrollo aéreo. Los resultados de las ecuaciones fueron entonces usados para examinar patrones de desarrollo y tasas de crecimiento. Las raíces alcanzaron 1.88 m en inicio de floración.

## **2.5 Rendimiento.**

De acuerdo con los resultados obtenidos en una investigación realizada por Livera (1984), con tres variedades de girasol de polinización libre, el rendimiento de semilla respondió a la densidad de población, pero no a los fertilizantes; en tanto que el rendimiento total de semilla presentó una respuesta positiva a la fertilización con

nitrógeno y a la densidad de población. Las tres variedades estudiadas respondieron de manera similar a los factores nitrógeno, fósforo, potasio y densidad de población.

Saumell (1976), menciona que el rendimiento está influido directamente por: La época de siembra, la fertilidad del suelo y las disponibilidades de temperatura y humedad con que se desarrolla el cultivo.

Johnson (1972), realizó estudios de fechas de siembra en girasol (*Helianthus annuus L.*) desde 1969 a 1971, para evaluar la fecha óptima de siembra en rendimiento de semilla, porcentaje de aceite, composición de aceite, y otras características de la planta. Mejores rendimientos de semilla y aceite fueron producidos cuando el girasol fue sembrado desde mediados de marzo hasta abril. Otras características del girasol no fueron afectadas grandemente excepto a las siembras de junio a julio.

Robinson (1970), señala que el rendimiento de grano en girasol se determina por tres factores: el número de capítulo por hectárea, el número de semillas por capítulo y el peso de semilla.

La producción de semilla en el cultivo del girasol está asociada con el peso seco y peso fresco de la semilla, el número de hojas, altura de planta y diámetro de capítulo, mostrándose un mayor efecto en los días a floración y diámetro de capítulo junto con el peso de semilla y altura de la planta a la inflorescencia, deben tener un mayor peso por volumen en la formación y selección de índices de producción en girasol citado por Olivares (1995).

D'Andria (1995), Menciona que el girasol es tolerante a déficit de agua y capaz de aguantar altos rendimientos en respuesta a irrigación, en ambas situaciones, el conocimiento del período de distribución de agua y la cuantificación de agua extraída en las capas de suelo profundo son requeridas para irrigación programada. En un estudio determinaron la composición del agua en relación con el rendimiento de semilla con ciclo

temprano (Primavera: mediados de abril) y tardío (Verano: mediados de junio) bajo cinco regímenes de irrigación: Un control del agua; reemplazó el período de evapotranspiración calculada del cultivo; una, dos o tres aplicaciones de riego en los estadios de crecimiento seleccionados suponiéndolos críticos para expresión de rendimiento. Los cultivos de primavera presentaron altos rendimientos (3.15 vs. 1.75 ton/ha ), los riegos fueron necesarios para lograr alta producción, especialmente para cultivos de verano. El tratamiento proveído de dos riegos siempre presentó similar rendimiento y más eficiencia al uso de agua con respecto al tratamiento regado de acuerdo a el acercamiento meteorológico y actuando mejor que el de un solo riego.

## **2.6 Contenido de Aceite y proteína.**

El alto contenido de aceite es un importante criterio de selección en el mejoramiento de girasol. La información sobre la correlación entre contenido de aceite y características de la semilla, es útil para determinar alguna asociación, que si alguna impide o ayuda materialmente en la selección para alto contenido de aceite. Fick (1974) encontró que en la correlación de coeficientes presentaron la asociación de contenido de aceite con el 50% de la floración, altura de planta, y prueba de peso fueron todos positivos y significativos al 5 o 1%. No define asociación de el contenido de aceite con la producción de semilla y peso de semilla.

Fick (1974 ), realizó estudios en variedades de polinización abierta e híbridos de girasol, estos presentaron correlaciones positivas de contenido de aceite en semilla con respecto a días a 50% de floración, altura de planta y prueba de peso, y una correlación negativa con reacción a roya moderadamente baja a condiciones severas de roya. No hubo asociación de contenido de aceite con rendimiento de semilla o peso de semilla. El contenido de aceite de líneas fue negativamente correlacionado con peso de semilla, pero no presentaron correlación con 50% de floración , altura de planta , reacción a roya, hojas por planta, diámetro de capítulo ó inclinación de capítulo. Las diferencias en

contenido de aceite fueron detectadas entre plantas  $F_2$  individuales con diferentes genotipos para recuperación de fertilidad, resistencia a royas, o resistencia a cenicilla vellosa. La recuperación de la fertilidad y resistencia a royas y cenicilla vellosa, son peculiarmente introducidas desde girasoles silvestres con contenido de aceite relativamente bajo y falta de asociación sugerida que estas peculiaridades puede ser realmente incorporado en genotipos de alto contenido de aceite. Un incremento en el contenido de aceite de alrededor de 2.5 % fue notado para semilla desde ramas de planta  $F_2$ , porque fueron comparados a prototipo de un solo capítulo.

### **Proteínas Solubles.**

Carter (1978), menciona que las proteínas de la semilla de girasol son caracterizadas por un bajo nivel moderado de albúminas y un alto nivel de globulinas. Las globulinas representan del 55 al 60 %, las albúminas de 17 a 25 %, glutelinas de 11 a 17 %, prolaminas de 1 a 4 % y el nitrógeno no proteico y residuos insolubles tienen menos del 11 % del total de nitrógeno. También menciona que en una investigación hecha en la URSS indica que una redistribución de fracciones de proteínas ha ocurrido durante la crianza de altas líneas de aceite, un cambio resulta en un aumento de la fracción de albúmina. Aparentemente las proteínas solubles en agua son activadas durante la síntesis del aceite y su nivel en mayo determina la concentración de aceite. La función de las globulinas en las sales solubles, es la reserva de proteínas. Borodulina y Supronova, citados por el autor, indican que el cultivo de girasol bajo condiciones de temporal tiende a incrementar la fracción de sales solubles y proteínas de baja calidad. La nutrición mineral también influye en la calidad.

Guerrero (1977), menciona que las albúminas de constitución, que se forman en las hojas en los primeros diez días después de la floración, contribuyen, también, a la síntesis de grasas. En cuanto a esto, la intensificación de la nutrición de la planta con nitrógeno durante la formación de las albúminas, y la acelerada migración de las mismas

desde las hojas al capítulo, presentan un interés práctico, que condiciona la acumulación más intensa de grasas. Según Diakow, citado por Guerrero (1977), el contenido de aceite de la almendra se puede considerar como un indicador del grado de abastecimiento con nitrógeno de las semillas en vía de formación, al depender la acumulación de aceite de las posibilidades de crecimiento más intenso de las semillas, lo que determina a su vez la intensificación de la síntesis de materias grasas por cuenta del nitrógeno absorbido.

Conociendo el antagonismo entre la biosíntesis del aceite y de las proteínas, se entiende que los factores ambientales o de cultivo que favorezcan la formación y acumulación intensa de aceite, actúan en detrimento del contenido relativo de proteínas y a la inversa.

En una investigación realizada por Jung (1993), describe la caracterización de proteínas resistentes a patógenos, inducidas por aspirina en discos de hojas de girasol. Menciona que un número de plantas pueden producir en respuesta a infección de patógenos, nuevas proteínas, quienes principian a numerosos cambios metabólicos. Más del 80% de las proteínas establecidas en los fluidos intercelulares de discos de hojas inducidas, son identificadas como proteínas relacionadas con patogénesis, por sus relaciones inmunológicas con proteínas resistentes a patógenos de tabaco. El autor propone para girasol una nomenclatura para proteínas resistentes a patógenos, que describe sus enlaces inmunológicos con las clases de proteínas resistentes a patógenos de tabaco. En la clase 1 detectaron un polipéptido de 17 kD, las proteínas resistentes a patógenos tipo 2 tiene un aparente peso molecular de 40 kD, las de tipo 3 de 29 y 37 kD y las tipo 5 de aproximadamente 20 kD.

Merrien (1987), realizó una investigación para conocer y seguir la proteogénesis y lipogénesis, e identificar claramente los factores agroclimáticos que influyen la acumulación de proteínas, apreciar la variabilidad de contenido de proteínas en el girasol, y probar la predominancia de factores edáficos aparentes dentro de la explicación de la variabilidad (profundidad de suelo, tasa de materia orgánica y disponibilidad de agua).

Estos parámetros influyen directamente sobre la cantidad total de nitrógeno disponible y sobre su absorción. El grado de alimentación en agua de la planta puede actuar sobre la asimilación tardía y por lo tanto incrementa la intensidad de la lipogénesis. En caso de sequía, se observa una aceleración de la senescencia de hojas.

La redistribución de nitrógeno foliar esta en estrecha relación con la cantidad de proteínas del grano. Los resultados confirmaron que el 68% del nitrógeno del grano en madurez proviene de las hojas. Dentro de esas hojas, la cantidad de proteínas tales como la Rubisco y su contenido de enzimas cloroplásticas bajó rápidamente provocando los fenómenos de senescencia.

Tocagni (1980), menciona que si el valor del componente proteico de la semilla sigue mejorando su posición relativa frente al aceite, en algún momento habrá que computarlo en la determinación de la comercial. Ello habrá de constituir, por otra parte, un factor de estímulo para que los fitotecnistas procuren la obtención de variedades con mayor contenido de proteínas, como así mismo para que los productores la adopten.

## **2.7 Electroforesis en gel.**

Se han producido técnicas para separar una mezcla de proteínas en un campo eléctrico, el medio que sirve de soporte es un polímero de la acrilamida unida a N,N'-baisacrilamida. El método de la electroforesis resulta útil por el llamado "tamaño del poro", es decir, que el gel actúa como un tamiz en forma directamente relacionada con su concentración. De esta manera, al aumentar las concentraciones del gel desde 3% hasta aproximadamente 9-10%, el tamaño del poro disminuye y las proteínas se movilizan más lentamente. Por medio de esta variable se pueden movilizar las proteínas cargadas y con ello resulta posible estudiar las proteínas de una gran variedad de tamaños.

El aparato que se emplea en estas técnicas, incluye una fuente de corriente directa, dos recipientes con sistemas amortiguadores (uno en la parte superior y otro en la parte inferior), los cuales se conectan mediante columnas de vidrio que contienen, en el

siguiente orden: la muestra de la proteína, el gel de carga y el gel para el desarrollo. En estas condiciones se abre el circuito de la corriente. Se emplea un colorante rastreador de la mezcla proteica que sirve como un indicador que permite observar como desciende la frontera de la zona en movimiento. Cuando la zona coloreada llega al fondo de la columna del gel, se suspende la corriente, se colorea en forma apropiada para observar el número de componentes proteicos. Conn y Stumpf (1986).

Rabilloud (1996), Menciona que la electroforesis es cada vez más usada para determinar porcentos de proteínas en análisis por composición de aminoácidos, microsecuencia y más recientemente determinación de masa con espectrometro de masa. En casi a todas las técnicas de análisis usadas en proteína química, las proteínas que son analizadas deben ser extraídas de la muestra biológica, sin cualquier sustancia la cual pueda interferir con la técnica analizada o los procesos subsecuentes y mantenerse en solución durante el proceso de separación total.

Sambrook (1989), cita que casi todos los análisis de electroforesis de proteínas son acarreadas hacia afuera en geles poliacrilamida bajo condiciones que aseguran la disociación de las proteínas en subunidades individuales de polipéptidos y que minimice la agregación. Más comúnmente el fuerte detergente SDS es usado en combinación con un agente reductor y calentado a disociación de las proteínas antes de que sean cargadas en el gel. En la mayoría de los casos, SDS-Poliacrilamida gel de electroforesis es acarreado hacia afuera con un sistema buffer discontinuo en el cuál el buffer de los depósitos es de un pH y carga iónica diferentes que el buffer usado para vaciar el gel. Los complejos SDS-Poliacrilamida en la muestra que es aplicada a el gel, son arrastradas a lo largo de un movimiento límite creado cuando una corriente eléctrica es pasada entre los electrodos. Después migran a través de un gel de carga de alta porosidad, los complejos son depositados en una zona muy fina en la superficie de el gel de desarrollo.

Tsugita *et al.* (1996), menciona que recientemente electroforesis bidimensional (2-DE) ha sido aplicada a las proteínas de plantas, especialmente de arroz y de *Arabidopsis*

y proteínas de hongos. En el caso de arroz, alrededor de 5 mil tejidos de proteínas fueron resueltas sobre gel poliacrilamida, con 100 bandas de proteínas analizadas por la secuencia N-terminal. Para *Arabidopsis* un número similar de proteínas fue encontrado y alrededor de 100 proteínas fueron secuenciadas. Las proteínas de espinaca estuvieron sujetas a electroforesis bidimensional y 334 proteínas fueron separadas, sobre 2-DE de arrastre, en proteínas de semillas de calabaza, 108 bandas de proteínas fueron observadas.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1 Localización del área de estudio.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el campo experimental de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, municipio de Saltillo, Coah. cuyas coordenadas geográficas son 25° 21' Latitud Norte y una Altitud de 1742 msnm.

#### 3.2 Material genético utilizado.

Se sembraron seis genotipos de girasol (*Helianthus annuus* L.), cuatro de ellos son producto de las investigaciones del Departamento de Fitomejoramiento de la UAAAN, y los otros dos genotipos son variedades comerciales de origen Argentino.

Cuadro 3.1 Material genético utilizado en el experimento.

VARIEDAD	ORIGEN
SAN 3-C	UAAAN-México
SANE 23578	UAAAN-México
SANE 1278	UAAAN-México
GORDIS	UAAAN-México
RIB 77	Argentina
KLM 123	Argentina

### **3.3 Siembra.**

Antes de la siembra se preparó el terreno con un barbecho y dos pasos de rastra. La siembra se realizó el día 10 de junio de 1996, bajo un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones, las parcelas fueron de 3,2m X 7m. Se sembró con sembradoras manuales a una distancia entre plantas de 0,25m colocando 2 semillas por golpe y a una distancia entre surcos de 0,8m a una profundidad de 7 cm aproximadamente.

### **3.4 Labores culturales.**

Antes de la siembra se preparó el terreno con un barbecho y dos pasos de rastra.

- **FERTILIZACIÓN:** Al momento de la siembra se aplicó una dosis de fertilizantes de 80-60-00 NPK, usando como fuente de Nitrógeno sulfato de amonio (20.5-00-00), y super fosfato simple como fuente de Fósforo.

- **ACLAREO:** A los 20 días de haber emergido las plántulas, cuando alcanzaron una altura entre los 20 y 25 cm, se realizó el aclareo, dejando la planta más vigorosa.

- **DESHIERBE:** El deshierbe se llevó a cabo manualmente con el fin de mantener el cultivo libre de malezas que compitan con las plantas cultivadas.

- **RIEGOS:** El primer riego se realizó al siguiente día de la siembra, el día 20 de junio se realizó el segundo riego, posteriormente no fue necesario aplicar otros riegos, ya que se presentó el período de lluvias durante el segundo y tercer mes del desarrollo del cultivo.

Cuadro 3.2. Fechas de riego y precipitación acumulada a los diferentes estadios.

Variedad	Fecha de Riego		Precipitación (mm)					
	12 Junio	20 Junio	E.E.	B.F.	I.F.	F.F.	M.F.	Cosecha
Siembra 10 Junio								
SAN-3C	RP	RP	44.6	67.2	92.6	121.4	233.7	276.5
SANE 23578	RP	RP	44.6	53	89.9	104.9	241.5	279.5
SANE 1278	RP	RP	44.6	53	89.9	104.9	241.5	276.5
GORDIS	RP	RP	44.6	66.2	91.6	108.7	242.3	276.5
RIB 77	RP	RP	44.6	66.2	91.6	106.3	259.5	276.5
KLM 123	RP	RP	44.6	67.2	92.6	125.1	259.5	276.5
RP= Riego Pesado								

- CONTROL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES: En las primeras etapas de desarrollo fue necesaria la aplicación de insecticidas (Lorsban y Pounce 500), ya que se presentaron plagas que atacaron el área foliar de las plantas. Después de la floración se aplicó un fungicida (Bayleton 25% PH).

- CUBRIR CAPÍTULOS: Cuando el 50% de las plantas llegaron a fin de floración, se cubrieron los capítulos con bolsas de papel, con el fin de evitar el daño por pájaros.

### 3.5 Fenología del girasol.

En el siguiente cuadro 3.3 se presentan los estadios observados en el cultivo del girasol (*Helianthus annuus* L.) (CETIOM, INRA. 1986), durante el ciclo de desarrollo.

Cuadro 3.3 Estadíos observados del girasol durante el ciclo de desarrollo del cultivo 1996.

Código CETIOM	Descripción del Estadío	Descripción de la Parcela	
B <sub>11</sub> -B <sub>12</sub>	La onceava hoja tiene 4 cm de largo y su peciolo es visible en la parte superior.		Fase Vegetativa
B <sub>13</sub> -B <sub>14</sub>	La treceava hoja tiene 4 cm de largo, el peciolo es visible en la parte superior.		
B <sub>15</sub> -B <sub>16</sub>	La quinceava hoja tiene 4 cm de largo, el peciolo es visible en la parte superior.		
B <sub>17</sub> -B <sub>18</sub>	La diecisieteava hoja tiene 4 cm de largo, su peciolo es visible en la parte superior.		
E <sub>1</sub>	Aparición del botón floral insertado en medio de las hojas jóvenes. ESTADÍO ESTRELLA.		Estadío  Botón Floral
E <sub>2</sub>	El botón se separa de la corona foliar. Las brácteas se distinguen netamente de las hojas. Su diámetro varía entre 0.5 y 2 cm.		
E <sub>3</sub>	El botón se separa de la última hoja, su diámetro varía entre 3 y 5 cm.		
E <sub>4</sub>	El botón está netamente separado de las hojas, su diámetro varía entre 5 y 8 cm.		
E <sub>5</sub>	El botón está aun cerrado, las flores liguladas son visibles entre las brácteas.	Todo debut de Floración	Floración
F <sub>1</sub>	El botón floral se inclina, las flores liguladas son perpendiculares al plato.	Inicio de Floración	

Nota: Un estadío es alcanzado en el cultivo cuando el 50% de las plantas están en ese estadío.

Cuadro 3.3. Continuación...

Código CETIOM	Descripción del Estado	Descripción de la parcela	
F <sub>3.2</sub>	Los tres círculos de los florones, los más externos, tienen sus anteras visibles y extendidas, y sus estigmas desarrollados. Los tres círculos siguientes tienen sus anteras visibles y desarrolladas.		Floración
F <sub>3.5</sub>	Los tres círculos de los florone, los más externos han sido fecundados. Los tres círculos siguientes tienen sus anteras y sus estigmas visibles y extendidas, los tres círculos siguientes tienen sus anteras visibles y extendidas. Los aquenios de la periferia son grises.		
F <sub>4</sub>	Todos los florones han florecido. Las flores liguladas se marchitan. Los aquenios ennegrecen y su tegumento endurece.	Fin de floración	Llenado de Grano
M <sub>0</sub>	Caída de las flores liguladas. El envés del capítulo esta todavía verde.	Inicio de Maduración.	
M <sub>1.1</sub>	El envés del capítulo es verde limón a verde amarillo. Las brácteas son verdes. La humedad del grano es aprox. de 50%.		
M <sub>1.2</sub>	El envés del capítulo es amarillo pálido. Las brácteas son amarillas. La humedad del grano es aproximadamente de 40 %.		
M <sub>2</sub>	El envés del capítulo es amarillo. Las brácteas son $\frac{3}{4}$ partes cafés. La humedad del grano es aproximadamente de 20-25%.	Madurez Fisiológica	Período de Cosecha
M <sub>3</sub>	El envés del capítulo es café. Las brácteas son cafés. El tallo se deseca. La humedad del grano es de aprox. 15%.		
M <sub>4</sub>	Todos los órganos de la planta son café fuerte. La humedad del grano es de 10%.	Maduración Completa	

### **3.6 Medidas efectuadas en curso del ciclo de desarrollo del cultivo de girasol.**

En cada parcela se seleccionaron 35 plantas en el estadio de 10 hojas tomando en cuenta su altura, diámetro de tallo, así como el vigor del mismo de tal forma que fueran representativas de la parcela. De entre esas 35 plantas 6 se monitorearon hasta madurez fisiológica en su desarrollo continuo mientras que el resto se destinaron a los muestreos que se tomaron en 6 estadios observados durante su desarrollo.

Efectivamente se distinguen dos grupos de plantas:

1<sup>er</sup> Grupo de 6 plantas para un monitoreo no destructivo para efectuar medidas biométricas no destructivas y que son la base para la selección de plantas del 2<sup>o</sup> Grupo en los estadios que a continuación se mencionan.

2<sup>o</sup> Grupo se etiquetaron y colectaron 4 plantas que fueron llevadas al laboratorio para mediciones y determinación de peso seco en cada uno de los siguientes estadios:

- Estadio Estrella
- Botón Floral
- Inicio de Floración
- Fin de Floración
- Madurez Fisiológica

Además se tomó una planta en el estadio de Botón Floral que se llevó al laboratorio en condiciones adecuadas para la determinación del Area Foliar.

### **3.7 Variables consideradas en el laboratorio.**

- 1.- Peso seco por órganos: tallos, hojas, pecíolos y capítulos.
- 2.- Área foliar

- 3.- Rendimiento
- 4.- Contenido de aceite de la semilla
- 5.- Contenido de proteína soluble
- 6.- Peso Molecular de las proteínas solubles

**3.7.1. Peso seco.-** Las plantas muestreadas por parcelas en los estadios señalados se transportaron al laboratorio en condiciones adecuadas y se separaron en: hojas, peciolo, tallos, Botón Floral o capítulos. Se colocaron en charolas de aluminio y fueron en seguida colocadas en una estufa MAPSA de secado a 80°C durante 72 horas o hasta peso seco, posteriormente se pesaron en balanzas de precisión METTLER y así obtener el peso seco .

**3.7.2. Area foliar.-** La planta muestreada en los diferentes estadios inmediatamente se le separaron las hojas, las que previa limpieza (eliminar tierra), se pasaron por la banda de un medidor automático de área marca HAYASHI DENKOH, LTD.

**3.7.3. Rendimiento.-** En el estadio fin de floración se cubrieron de 10 a 15 capítulos de las plantas por parcela para evitar el daño de pájaros y contar con suficientes muestras para la fase de cosecha y así tomar todos los datos necesarios de rendimiento. Cuando las plantas se encontraban completamente maduras se muestrearon y llevaron al laboratorio aproximadamente 10 plantas, los capítulos, y ocho de ellas se colocaron en la estufa hasta peso seco para posteriormente desgranarlos y obtener rendimiento. Las dos plantas restantes se desgranaron en fresco y la semilla se colocó en cajas de aluminio en la estufa de secado MAPSA a 103°C durante 16 horas para determinar la humedad que traían del campo los capítulos según la normatividad establecida para determinar la humedad de campo de semillas oleginosas.

**3.7.4. Contenido de aceite.-** La semilla del rendimiento se limpió de impurezas y se homogenizó en un homegenizador Seed Buró, en seguida se tomaron 50 gr. de muestra

y se molieron aproximadamente 20 gr. en un molino Wiley con un tamiz de 1 cm. de diámetro e inmediatamente se tomaron 2 muestras de 5 gr. c/u  $\pm$  0.05 pesada en balanza analítica las cuales se colocaron en papel filtro dentro de cartuchos de extracción de 33 x 80 mm y en seguida se llevó al sifón del extractor Soxhlet en donde se realizó la extracción de aceite usando como disolvente hexano (250 mls) y durante 8 horas continuas.

**3.7.5. Contenido de proteína cruda.-** De la muestra homogenizada y molida en 3.7.4 se tomaron muestras de un gramo por duplicado por parcela las que se analizaron para contenido de nitrógeno en extractor Kjeldahl, por ciento que multiplicado por el factor 6.25, dió como resultado el contenido de proteína cruda.

**3.7.6. Determinación de proteínas solubles: Foliares y en semilla.-** Para este estudio se muestreó por parcela una planta en los diferentes estadios los cuales se trasladaron del campo al laboratorio, se colocaron en refrigeración, en seguida se separaron las hojas por niveles (4 niveles) considerando de la hoja verde más baja hacia arriba es decir en función de su desarrollo, en seguida se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta el momento del análisis.

Para el análisis se consideró el 2° nivel de hojas como un estándar de las muestras colectadas durante el ciclo de desarrollo. Este nivel incluía la hoja "joven adulta" es decir completamente desarrollada.

En seguida las hojas se liofilizan durante 24 horas y cuando se tuvo la muestra de semilla, también se liofilizó

#### **3.7.6.1. Extracción de proteínas.**

De las hojas y semillas de girasol liofilizadas se extrajeron las proteínas con la técnica modificada del método descrito en el catalogo de Bio-Rad. Posteriormente se



molieron en un mortero, agregando Nitrógeno líquido y moliendo hasta pulverizar la muestra. Se pesaron 300 mg de la muestra y fueron suspendidas en 25 ml de disolvente acetona concentrada fría. Posteriormente permanecieron por 60 minutos en refrigeración a 4° C. La suspensión fue centrifugada a 15000 r.p.m. por 15 minutos, enseguida fue centrifugado con acetona hasta que el precipitado perdió la mayor cantidad de pigmento posible ( clorofila). Después fueron suspendidas en 3 ml de buffer de fosfatos con un pH de 7.0 con 2% de Polovinil Piruvato (PVP), las muestras permanecieron durante 30 minutos a 4° C y, fueron nuevamente centrifugadas a 15000 r.p.m. a 6° C por 20 minutos, posteriormente el sobrenadante se separó del precipitado, y fue almacenado en viales que se colocaron en refrigeración.

### **3.7.6.2. Cuantificación de proteínas de la muestra.**

La concentración de proteínas de la muestra fue determinada en el espectrofotómetro de luz ultravioleta a una longitud de onda de 595 nm. La muestra fue diluída a 0.1 en 10 ml de buffer de fosfatos con un pH de 6.0, fueron tomados 2.4 ml de la dilución y se agregó 0.6 ml de reactivo para teñir de Bio-Rad, usando albúmina como estándar. Posteriormente de las diluciones se tomó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro.

Previamente se elaboró una curva de calibración para determinación de proteínas y se cuantificaron con la siguiente formula:

$$\mu\text{g de Proteína} = \text{Absorbancia} - 0.02079 / 0.004704$$

### **3.7.7. Determinación de los pesos moleculares de las proteínas.**

#### **3.7.7.1. Método de electroforesis**

La electroforesis es un método de separación por el cual las partículas cargadas electricamente se desplazan dentro o sobre un soporte bajo de acción de un campo

eléctrico. Como regla general, la movilidad electroforética de las moléculas y partículas está gobernado solamente por el potencial a su superficie y no depende de su tamaño ni de su forma.

Cuando las migraciones se hacen en un medio que presenta una viscosidad notable (gel), fuerzas de fricción aparecen. Así luego de su desplazamiento, las partículas son sometidas a fuerzas antagonistas: unas dependen de su carga y del valor del campo que las forzan a migrar, las otras ligadas a su forma y a las características del medio y del soporte que tenderá a frenerlas.

Este método se utiliza para separar mezclas de proteínas (Godon, 1985). La mayoría de las electroforesis analíticas de proteínas se lleva a cabo en geles de poliacrilamida bajo condiciones que aseguran la disociación de proteínas en sus subunidades individuales del polipéptido que minimiza la agregación.

### **3.7.7.2. Electroforesis de proteínas por el gel dodecil sulfato de sodio (SDS) de poliacrilamida**

Material: De la muestra obtenida de la extracción de proteínas por el Método Modificado de Laemmli (1970) se efectúa la separación de las mismas por electroforesis.

#### **REACTIVOS.**

\* **Acrilamida y N,N- metilenebisacrilamida.**

Una solución stock contiene 29% (p/v) de acrilamida y 1% (p/v) de N,N-metilenebisacrilamida son preparadas en agua desnionizada. Examinar que el pH de la solución sea de 7.0 o menor y depositar la solución en una botella oscura a temperatura ambiente.

\* **Dodecil sulfato de sodio (SDS).** Una solución stock al 10% (p/v) es preparada en agua desionizada y almacenada a temperatura ambiente.

\* **Buffers Tris** para la preparación de gel de carga y gel de desarrollo: Es esencial que este buffer sea preparado con Tris base. El Tris base tiene que ser disuelto en agua desionizada, el pH de la solución debe ser ajustado con HCl dependiendo si es de carga (pH=6.8) o para el de desarrollo (pH=8.8)

\* **TEMED** (N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina): TEMED es acelerador de la polimerización de acrilamida y bisacrilamida catalizando la formación de radicales libres por persulfato de amonio. TEMED trabaja solamente con una base libre, la polimerización es inhibida a pH bajo.

• **Persulfato de amonio:** El persulfato de amonio provee los radicales libres que maneja la polimerización de acrilamida y bisacrilamida. Una solución al 10% ( p/v ) fue preparada en agua desionizada y almacenada a 4°C. El persulfato de amonio se descompone lentamente, y soluciones frescas deben ser preparadas semanalmente. Este reactivo se adquirió en Sigma Co. Química.

\* **Buffer Tris-glicina de electroforesis:** Este buffer contiene 25 mM de Tris base, 250 mM de glicina (pH 8.3), 0.1% SDS. Una solución 5X fue preparada por disolución de 15.1 g de Tris base y 94 g de glicina en 900 ml de agua desionizada. Además, se adicionaron 50 ml de solución stock al 10% ( p/v ) de SDS, y el volumen se ajustó a 1000 ml con agua desionizada. La glicina se adquirió en Sigma Co. Química.

Se prepararon 100 ml de Gel de Desarrollo con 12% de Acrilamida como se presenta en el cuadro 3.4

Cuadro 3.4 Preparación de Gel de Desarrollo para Electroforesis

Componentes de la Solución	Volumen (ml)
H <sub>2</sub> O	33.0
Acrilamida al 30%	40.0
Tris 1.5 M (pH 8.8)	25.0
SDS al 10%	1.0
Persulfato de amonio al 10%	1.0
TEMED	0.04

Se prepararon 30 ml de Gel de Carga con 5% de acrilamida como se muestra en el cuadro No. 3.5

Cuadro 3.5 Preparación de Gel de Carga para Electroforesis

Componentes de la Solución	Volumen (ml)
H <sub>2</sub> O	20.4
Acrilamida al 30%	5.1
Tris 1.0 M (pH 6.8)	3.75
SDS al 10%	0.3
Persulfato de amonio al 10%	0.3
TEMED	0.03

### 3.7.7.3. Vaciado de los geles SDS-Poliacrilamida.

1.- Los cristales del aparato de electroforesis fueron ensamblados cuidadosamente.

2.- En un matraz Erlenmeyer, fueron preparados 100 ml de solución que tiene una concentración de 12% de acrilamida para el gel de desarrollo, usando los valores dados en el cuadro No. 3.3, los componentes fueron mezclados en el orden presentado. La polimerización empezó un poco después que el TEMED fue agregado.

3.- Posteriormente se vació la solución acrilamida en el hueco entre los cristales, dejando suficiente espacio para el gel de carga ( la longitud de los dientes del peine más un centímetro ). Usando una pipeta Pasteur, cuidadosamente se cubrió la solución con isobutanol. El recubrir impide que el oxígeno se difunda entre el gel e inhíba la polimerización.

4.- Después que el gel ha polimerizado, fue retirado el isobutanol con una toalla de papel de estraza.

5.- Para el gel de carga fueron preparados 30 ml de la solución que contiene 5% de acrilamida, usando las cantidades dadas en el cuadro No. 3.4, se mezclaron los componentes en el orden presentado.

6.- Se colocó la solución de gel de desarrollo directamente sobre la superficie del gel ya polimerizado. Inmediatamente fue insertado un peine Teflon limpio en la solución de gel de carga, se tuvo cuidado de no atrapar burbujas de aire.

7.- Cuando el gel polimerizo, se quitó el peine cuidadosamente.

Se agregó el buffer Tris-glicina a la parte de arriba y el fondo de reserva del aparato. Se debe de tener cuidado de quitar la burbujas que puedan quedar en el fondo del gel entre los cristales. Esto se hizo con una pipeta Pasteur encorvada.

#### **3.7.7.4. Preparación de muestras.**

Las muestras fueron mezcladas, el volumen equivalente a 100  $\mu$ g de proteína , con un volumen igual de buffer SDS, que fue preparado en agua desionizada, este buffer se preparó con los siguientes reactivos: Tris HCl 50 mM ( pH 6.8 ),

Mercaptoetanol 100 mM, SDS al 2%, Azul de Bromofenol al 0.1% y Glicerol al 10%.

El mercaptoetanol tiene que ser agregado, justo cuando el buffer es usado.

Las muestras de proteína ya preparadas con el buffer y los marcadores de peso molecular, fueron calentados a 100° C por 3 minutos para desnaturalizar las proteínas.

Las muestras fueron colocadas cuidadosamente en el fondo de los orificios del peine con ayuda de una microjeringa. En los extremos del gel se colocaron 120  $\mu$ g de los marcadores de peso molecular, que se señalan después del siguiente párrafo.

Enseguida se colocó la cubierta de protección del aparato y éste fue conectado a un suministro de energía eléctrica. Al principio se aplicó un voltaje de 130 Voltios, posteriormente cuando la mancha pasó al segundo gel, se aumentó el voltaje a 180 voltios que se mantuvo constante durante el corrimiento de las proteínas que se dió en un período de 9 horas aproximadamente.

#### **3.7.7.5. Marcadores Estándar de Proteínas.**

Las siguientes proteínas de conocido peso molecular fueron usadas como marcadores:  $\alpha_2$ -Macroglobulin (205,000 Daltons),  $\beta$ -Galactoside (116,000 D), Phosphorilasa b (97,000 D), Suero de albúmina (66,000 D), Fumarasa (48,500 D), Anhidrasa Carbónica (29,000 D),  $\beta$ -Lactoglobulina (18,400 D) y  $\alpha$ -Lactalbúmina (14,200 D).

Cada vial de muestra contiene 200  $\mu$ l de una mezcla de proteínas en 300 mM de NaCl, 3 mM de  $\text{NaN}_3$ , y 50% de glicerol; cada vial de muestra de buffer Laemmli contienen 6 mls de SDS al 4%, 10% de glicerol, y 10% de 2-mercaptoetanol en trizma Base 0.125 M, pH 6.8.

Se hizo una dilución, mezclando completamente los componentes del vial de muestra con la muestra de buffer Laemmli. Los marcadores de proteínas estándar fueron adquiridos de la Compañía Química Sigma.

#### **3.7.7.6. Tinción de geles SDS-Poliacrilamida con Azul Brillante Comassie.**

Las proteínas que quedaron dentro del gel fueron fijadas con una solución preparada con 0.25 g de Azul Brillante Comassie R250 en 90 ml de metanol:agua ( 1:1 v/v) y 10 ml de ácido acético glacial.

El gel se colocó en un recipiente y el colorante fue agregado, se puso el recipiente en una plataforma de agitación lenta por un período de tiempo de 5 horas, después el colorante fue removido y se guardó para usarlo en un futuro.

Para desteñir el gel se preparó una solución de metanol / ácido acético sin colorante. El gel con esta solución se colocó sobre una plataforma de agitación, cambiando la solución cada 3 a 4 horas hasta quitar el exceso de colorante.

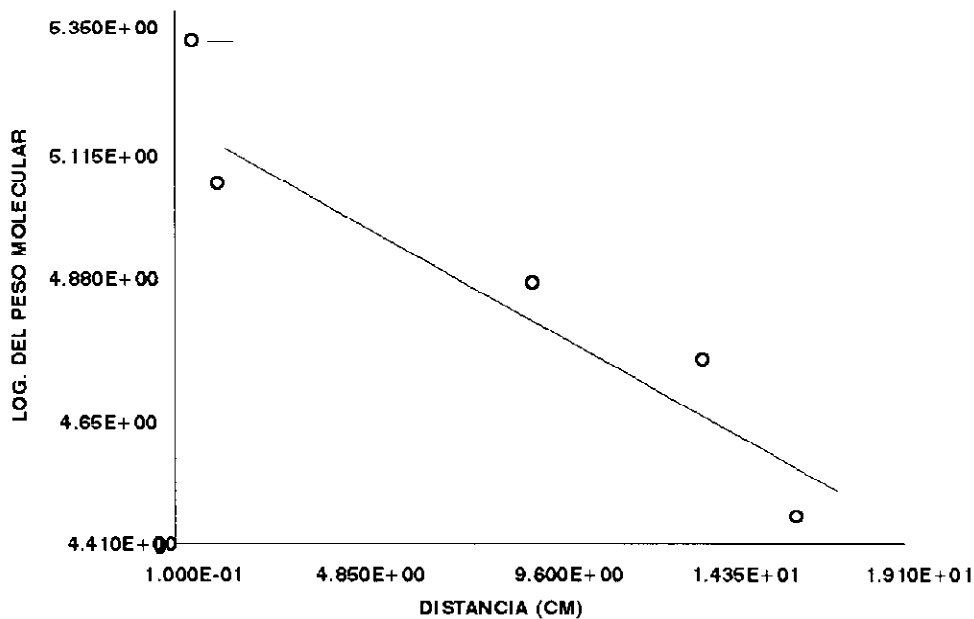
Para conservar el gel se preparó una solución de glicerol al 20%.

#### **3.7.7.7. Determinación de pesos moleculares.**

Para obtener el peso molecular de cada una de las bandas presentadas en los geles, se elaboró una curva de calibración con los marcadores standard de peso molecular. Esta curva se hizo graficando el logaritmo de los pesos moleculares con la distancia de las bandas de las proteínas standard. Para lo anterior el gel fue teñido con nitrato de plata.

Se midieron las distancias de las bandas de las proteínas analizadas y para sacar el peso de cada una de ellas se extrapolaron en la curva de calibración mostrada en la Figura 3.1.

**Figura 3.1** Curva de calibración de marcadores de peso molecular



### 3.7.8. Análisis de datos

Con los datos de las temperaturas que se presentaron durante el ciclo del cultivo se determinaron las Unidades Calor Acumuladas (U.C.A.) de acuerdo con Jaffar *et al.* (1993).

Con los resultados de las variables evaluadas en nuestro estudio se desarrollaron las gráficas que muestran las mismas tendencias para las variedades observadas. Asimismo se efectuaron correlaciones usando el paquete de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1 Condiciones Climáticas

Los datos de temperatura y de precipitación obtenidos durante el período de desarrollo del cultivo que fue de los meses de Junio a Octubre de 1996, se presentan en el Cuadro 4.1

Cuadro 4.1 Temperaturas y precipitación reportadas para el área de estudio durante el ciclo de desarrollo del cultivo.

MESES	TEMPERATURA °C			PRECIPITACIÓN (mm)
	MAX.	MIN.	MED.	
Junio	28.5	17.0	22.7	0.0
Julio	29.1	17.2	23.1	53.0
Agosto	26.3	15.9	21.1	150.0
Septiembre	26.0	14.5	20.3	59.5
Octubre	23.6	9.1	16.4	13.0

Fuente: Departamento de Agrometeorología de la UAAAN.

La temperatura media del aire influye sobre la velocidad de desarrollo del cultivo, que fuera de ciertos límites puede afectarlo provocando mermas en su rendimiento y asimismo tiene influencia en el contenido de aceite y de ácidos grasos de la semilla (Saumell 1976).

Según Robles (1985), los requerimientos de agua para el girasol son de 400 a 500 mm repartidos en el ciclo vegetativo de la planta, ya sea por medio de riego, o de precipitación pluvial.

La precipitación durante el desarrollo del cultivo fue de alrededor de 275 mm y se aplicaron 2 riegos en la fase vegetativa a los 2 y 10 Días Después de la Siembra. Posteriormente debido al período de lluvias se dejó el desarrollo al temporal.

#### 4.2 Fenología y Unidades Calor .

El Cuadro 4.2 presenta los días que requirió cada una de las variedades para alcanzar los principales estadios de desarrollo del cultivo de girasol ( CETIOM, 1986 ). Las variedades más precoces fueron la GORDIS, SANE 23578 y la SANE1278, alcanzando la madurez fisiológica a los 93 y 94 días después de la siembra respectivamente y la más tardía fue la SAN 3-C con 105 días. Las variedades comerciales RIB 77 y KLM 123 utilizadas como testigos alcanzaron la madurez fisiológica a los 100 días.

Cuadro 4.2. Días que requirieron las diferentes variedades para alcanzar los principales estadios de desarrollo.

VARIETADES	E. ESTRELLA E <sub>1</sub>	BOTON FLORAL E <sub>3</sub>	INICIO DE FLORACION F <sub>1</sub>	FIN DE FLORACION F <sub>4</sub>	MADUREZ FISIOLOGICA M <sub>2</sub>	COSECHA M <sub>4</sub>
SAN 3-C	40	55	65	76	105	135
SANE 23578	38	50	61	71	94	128
SANE 1278	38	50	61	71	94	130
GORDIS	40	53	67	72	93	130
RIB 77	38	51	61	71	100	133
KLM 123	42	55	66	77	100	133

En el Cuadro 4.3 se presentan las Unidades Calor Acumuladas (U. C. A. en °C) reportadas por las variedades para alcanzar cada uno de los principales estadios de desarrollo de las variedades cultivadas. En el Estadio E<sub>1</sub> las variedades que requirieron menor número de U.C.A., fueron la SANE 23578, SANE 1278 y RIB 77 ( 540.5 ), la SAN- 3C y la GORDIS requieren de aproximadamente 573.1 U.C., y la que requiere mayor número de U.C. es la KLM 123 con 576.6. El Estadio E<sub>3</sub> fue alcanzado primeramente por las variedades SANE 23578 y SANE 1278 con 709.4 U.C., la GORDIS y RIB 77 requieren acumular 761 y 726 U.C. para alcanzar este estadio, y las variedades SAN 3-C y KLM 123 requieren igual número de U. C. (823). La etapa de F<sub>1</sub> se presentó primero para las variedades SANE 23578, SANE 1278 y RIB 77, con 862.2 U. C., seguidas de la SAN-3C con 949.8, por último las variedades KLM 123 y GORDIS con 964 y 978.9 U. C. respectivamente. Para el Estadio F<sub>4</sub>, nuevamente las variedades SANE 23578, SANE 1278 y RIB 77 fueron las primeras en alcanzar este estadio con un total de 988.6 U.C.A., la GORDIS requirió de 998.9 U.C.A. y las variedades SAN 3-C y KLM 123 alcanzaron este estadio con 1087.9 U.C. En la madurez fisiológica (M<sub>2</sub>), la variedad más precoz fue la GORDIS con 1250.8 U.C.A., seguida de SANE 23578 y SANE 1278 que requirieron de un total de 1264.2 U.C.A., y las variedades Argentinas requirieron para este estadio de igual número de U.C.A. ( 1363.4), y la que acumuló un mayor número fue la SAN 3C con 1437.3. Para el período de cosecha fue alcanzado primero por la variedad SANE 23578 con un total de 1609.4 U.C.A., seguida por las variedades SANE 1278 Y GORDIS con 1625.3, las variedades Argentinas necesitaron de un total de 1642.3 U.C.A. y la más tardía fué la variedad SAN 3-C que acumuló 1661.2 U.C.

Comparando las variedades mejoradas en la UAAAN con las Argentinas, la SANE 23578, y SANE 1278 tuvieron un requerimiento de U.C.A. muy similar a la RIB 77 y la variedad SAN 3C que fue la más tardía también presentó un requerimiento muy similar de U.C.A. con respecto de la KLM 123

Cuadro 4.3 Unidades Calor Acumuladas (U.C.A.) en °C en los principales estadios de desarrollo del cultivo del girasol.

VARIETADES	E. Estrella E <sub>1</sub>	Botón Floral E <sub>3</sub>	Inicio de Floración F <sub>1</sub>	Fin de floración F <sub>4</sub>	Madurez Fisiológica M <sub>2</sub>	Cosecha M <sub>4</sub>
SAN 3-C	573.1	823	949.8	1072.8	1437.3	1661.2
SANE 23578	540.5	709.4	862.2	988.6	1264.2	1609.4
SANE 1278	540.5	709.4	862.2	988.6	1264.2	1625.3
GORDIS	573.1	761.9	978.9	998.9	1250.8	1625.3
RIB 77	540.5	726.7	862.2	988.6	1363.4	1642.3
KLM 123	576.6	823	964.0	1087.9	1363.4	1642.3

McWilliams *et al.* (1976), citado por Ortegón (1993), observaron que la madurez fisiológica se alcanzó con 650 unidades calor acumuladas después de la floración. Robertson *et al.* (1978), también citado por Ortegón (1993) señalan que 35 días después de iniciada la floración, obtuvieron los máximos pesos de la semilla y el contenido de aceite y de ácidos grasos. A esta edad se le denominó madurez fisiológica, y para ello se acumularon 902 unidades calor. En nuestro estudio se requirió un mayor número de U.C.A. para el estadio M<sub>2</sub> y fue en general para todas las variedades.

#### 4.3 Area Foliar e Indice de Area Foliar

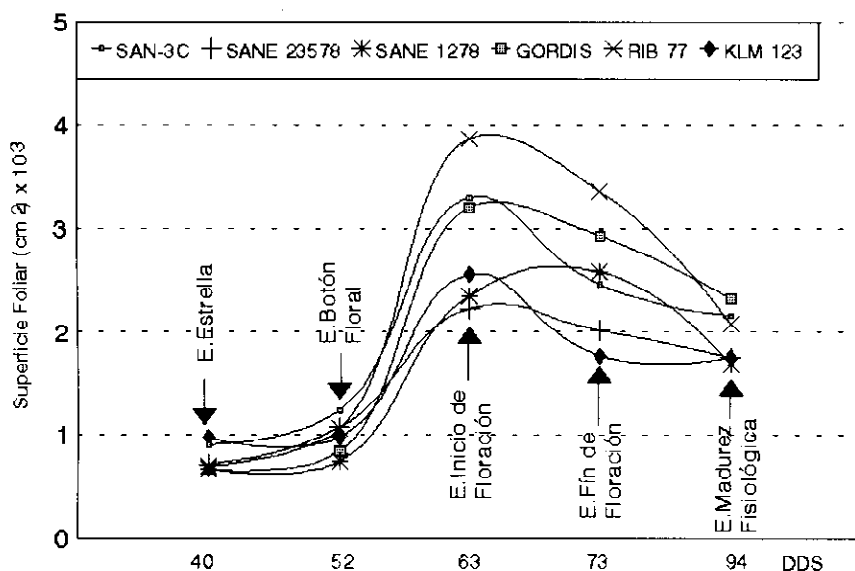
La superficie foliar capta la energía luminosa, por lo que su rol es esencial. En el caso del girasol la superficie foliar esta ligada a la disponibilidad de agua en la parcela así como a su nivel de fertilización.

Por lo anterior la Figura 4.1 presenta la evolución de la superficie foliar de las seis variedades de Girasol durante el ciclo del cultivo.

Podemos observar que en el Estadío Estrella (40 DDS) las variedades SANE (23578 y 1278) así como la GORDIS y la RIB 77 presentan aproximadamente la misma superficie que fué de 665 a 712 cm<sup>2</sup>, las variedades SAN-3C y KLM 123 presentaron mayor desarrollo foliar con 904 y 975 cm<sup>2</sup> respectivamente.

Las variedades en general reportaron mayor superficie foliar en el Estadío Inicio de Floración en donde la var. RIB 77 obtuvo 3850 cm<sup>2</sup> (más alto valor) seguida de la SAN-3C y la GORDIS con 3295 cm<sup>2</sup> y 3198 cm<sup>2</sup> respectivamente y finalmente las var. KLM 123, SANE (1278 y 23578) reportaron la superficie foliar mas baja que fue de 2559 cm<sup>2</sup>, 2352 cm<sup>2</sup> y 2228 cm<sup>2</sup> respectivamente. Únicamente la SANE 1278 reporta el máximo de superficie foliar en el Estadío fin de Floración (2584 cm<sup>2</sup>).

**Figura 4.1 Evolución del Area foliar en seis variedades de Girasol durante el ciclo de desarrollo**



El cuadro 4.4 presenta los valores de Índice de Area Foliar para las Variedades.

Cuadro 4.4 Índice de Area Foliar (I.A.F.) para las variedades en estudio, en los estadios Inicio de Floración y Fin de Floración.

Variedad	I.A.F. Inicio de Floración	I.A.F Fin de Floración
SAN-3C	1.6	
SANE 23578	1.11	
SANE 1278	1.17	1.29
GORDIS	1.59	
RIB 77	1.92	
KLM 123	1.27	

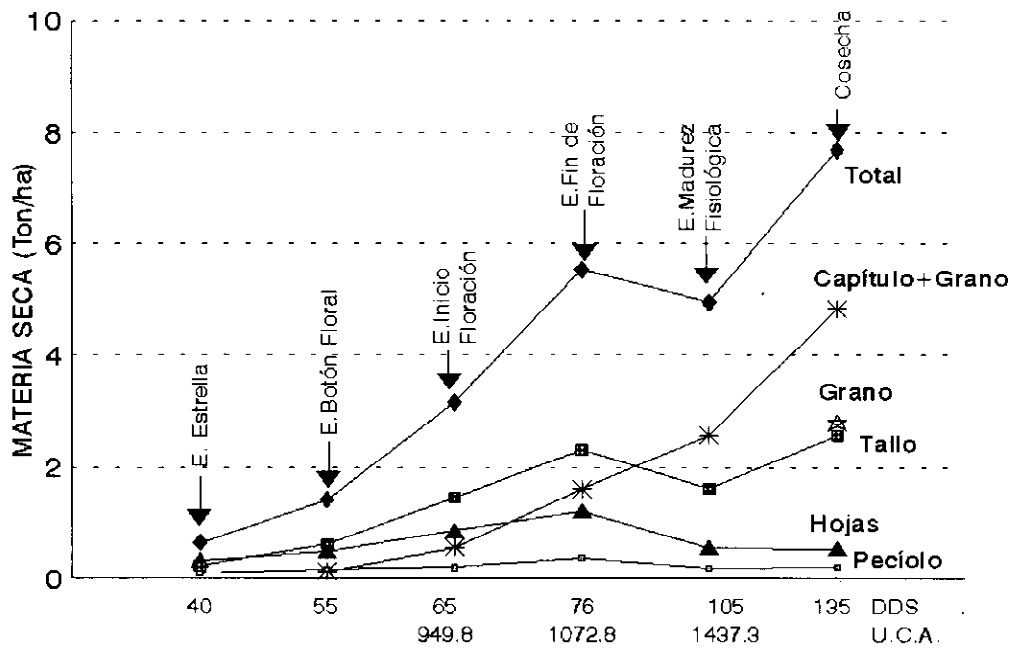
Los valores obtenidos de I.A.F. son bajos con respecto a los reportados por Merrien (1992).

#### 4.4 Producción de Materia Seca

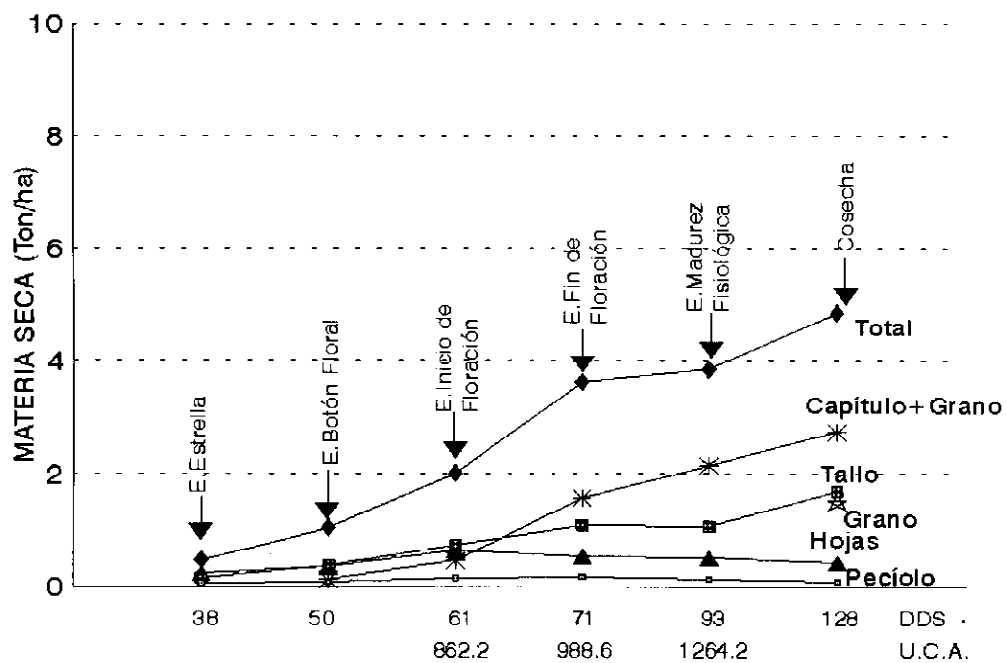
##### 4.4.1 Variedad SAN 3-C

La Figura 4.2 presenta la evolución de materia seca en toneladas por hectárea de los órganos aéreos y del total de la planta en seis estadios de desarrollo. Podemos apreciar que la distribución de la materia seca total acumulada es de 7.6 toneladas por hectárea, que fue el rendimiento mas alto de todas las variedades estudiadas en este trabajo. Observando la distribución de materia seca en hojas y pecíolos, alcanzan su punto máximo de acumulación al inicio de floración (73 días), alcanzando 0.5 y 0.2 toneladas respectivamente, a partir de ahí la biomasa decreció; el tallo alcanza su valor máximo hasta el término de su desarrollo. En cuanto a la acumulación de materia seca en el

**Figura 4.2 Acumulación de materia seca en Ton/ha de Girasol variedad SAN-3C**



**Figura 4.3 Acumulación de materia seca en Ton/ha de Girasol variedad SANE 23578**



capítulo más grano, ésta se incrementa constantemente, haciéndose más notable a partir de los 63 días después de la siembra (Inicio de Floración), teniendo un rendimiento de 4.8 toneladas por hectárea en cosecha.

#### **4.4.2 Variedad SANE 23578**

La Figura 4.3 presenta los resultados de acumulación de materia seca de la variedad SANE 23578 la que muestra la misma tendencia que la variedad SAN-3C en la distribución de hojas, tallo y pecíolos. Esta variedad fue la que presentó el valor mas bajo, se observa una ganancia de biomasa total de 4.85 toneladas por hectárea, la ganancia máxima en hojas y pecíolos es de 0.42 y 0.09 toneladas respectivamente; refiriéndonos al tallo, la biomasa se incrementa a partir de la formación del botón floral hasta la madurez comercial. En los resultados de capítulo mas grano se aprecia que la tendencia de la acumulación de biomasa fue en incremento hasta alcanzar 2.720 toneladas por hectárea en la cosecha.

#### **4.4.3 Variedad SANE 1278**

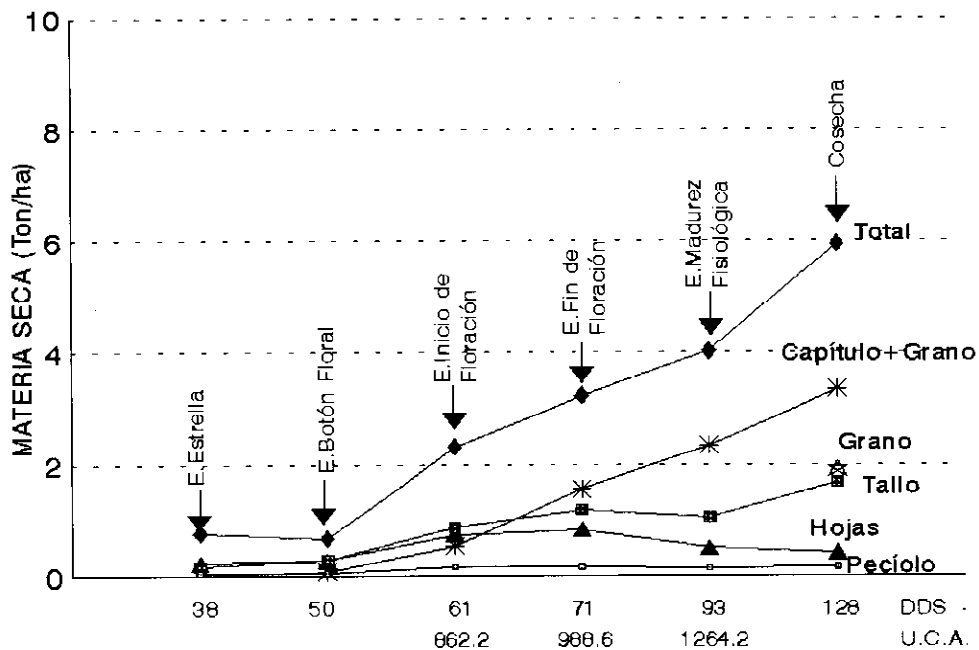
La Figura 4.4 se refiere a la evolución de la materia seca de la variedad SANE 1278 en los diferentes estadios de desarrollo de su cultivo, mostrando que en esta variedad la biomasa total fue de 5.947 toneladas en la etapa de cosecha, a los 61 días después de la siembra se observa el mas alto valor de peso seco en hojas y en los siguientes estadios va en descenso. En cuanto al tallo, alcanzó su mayor valor al final del desarrollo del cultivo, con 1.7 toneladas. Se puede observar el notable incremento en la materia seca del capítulo más grano después de los 52 DDS , que es cuando comienza la formación de los órganos reproductivos, la ganancia máxima de biomasa del capítulo más grano fué de 3.35 toneladas en la cosecha.

#### **4.4.4 Variedad GORDIS**

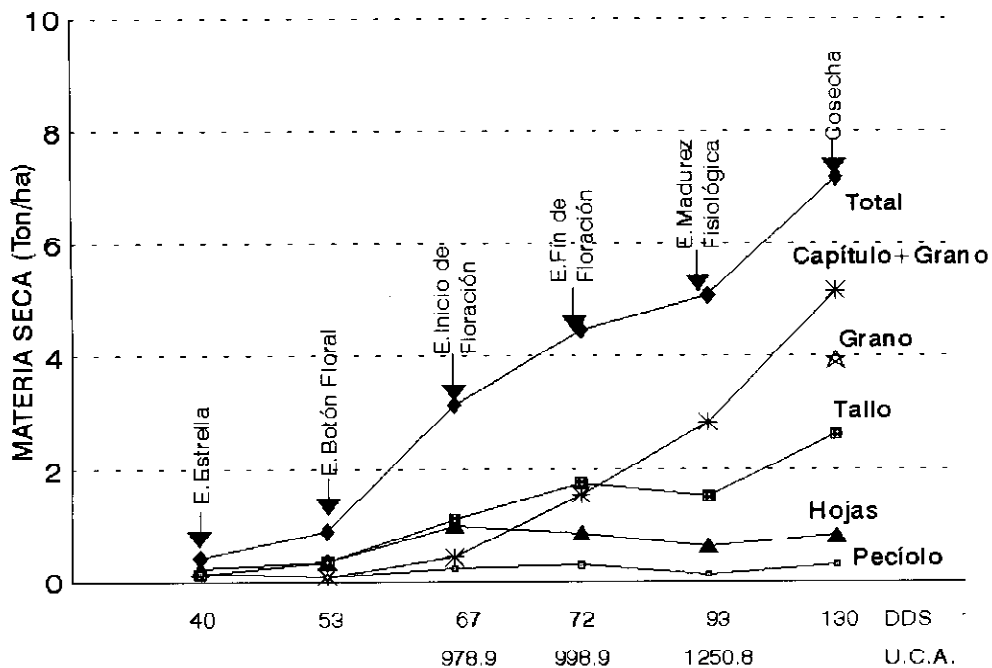
La Figura 4.5 presenta el comportamiento de acumulación de biomasa en toneladas por hectárea de la variedad Gordis en diferentes estadios de desarrollo del cultivo, se puede observar que la ganancia máxima de materia seca en hojas y pecíolos se



**Figura 4.4 Acumulación de materia seca en Ton/ha de Girasol variedad SANE 1278**



**Figura 4.5 Acumulación de materia seca en Ton/ha de Girasol variedad GORDIS**



dá a los 63 días, teniendo en los siguientes estadios un decremento de biomasa; en el tallo el valor máximo de peso seco se observa en cosecha, en lo referente al peso del capítulo más grano, se observa al igual que en las otras variedades un notable incremento principalmente después de iniciada la floración, este tuvo al final de la floración una ganancia de 5.168 toneladas; la ganancia total de materia seca en la cosecha fue de 7.182 toneladas, que representa el segundo lugar de materia seca total, comparada con el rendimiento total de las demás variedades estudiadas en este trabajo.

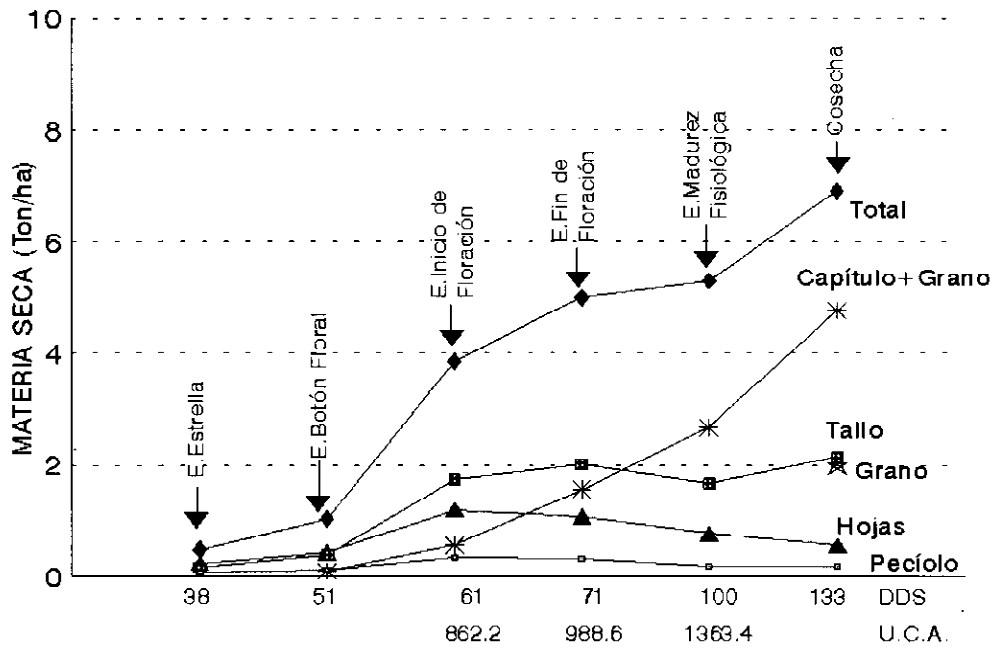
#### **4.4.5 Variedad RIB 77**

La Figura 4.6 se refiere a la redistribución de la biomasa de la variedad RIB 77, mostrando que el mayor peso de materia seca en las hojas y pecíolos se presentó a los 61 DDS aproximadamente con 0.56 y 0.17 toneladas por hectárea respectivamente, el peso de tallos alcanzó su más alto valor en la cosecha con 2.15 toneladas, en lo que a peso de capítulo más grano se refiere, esta variedad obtuvo un rendimiento de materia seca de 4.76 toneladas. En cuanto al peso de materia seca total de la parte aérea de la planta, esta variedad obtuvo un promedio de 6.915 toneladas por hectárea, colocándose así en el tercer lugar en rendimiento de biomasa de las variedades estudiadas en este trabajo.

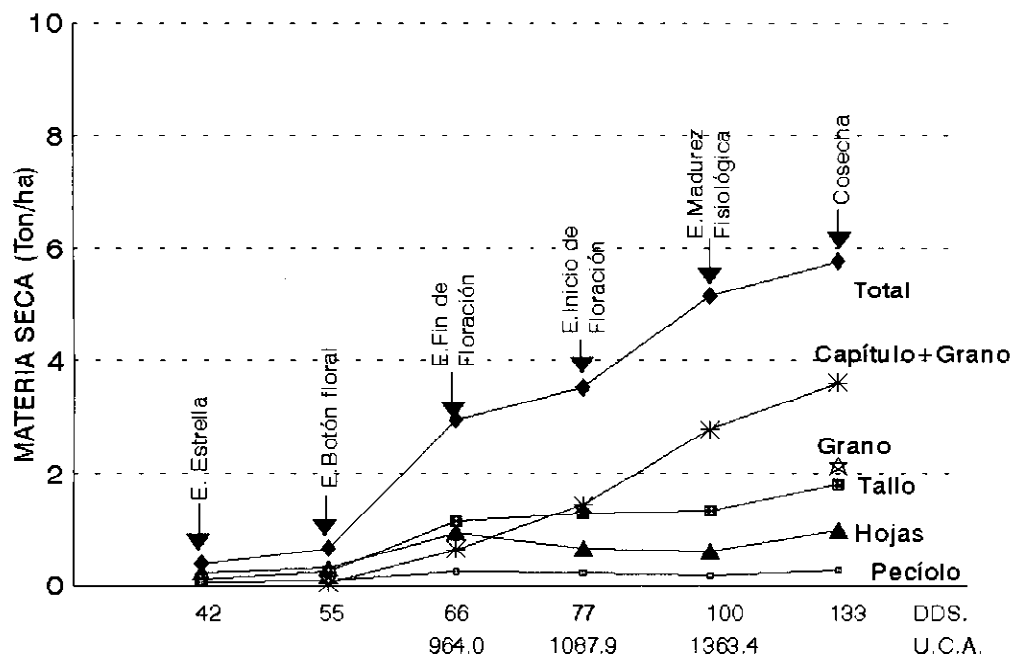
#### **4.4.6 Variedad KLM 123**

La evolución de la materia seca de esta variedad se presenta en la Figura 4.7 El total de biomasa acumulada fue de 5.76 toneladas por hectárea. La mayor acumulación de materia seca en hojas y pecíolos fue a los 68 días aproximadamente, alcanzando 0.93 y 0.24 toneladas respectivamente, el peso seco de estos órganos disminuyó en los siguientes estadios de desarrollo del cultivo. En lo que a peso seco de capítulo más grano se refiere, se puede apreciar que después del estadio de botón floral hay un considerable aumento hasta la cosecha que es donde alcanzó su valor máximo que fue de 3.6 toneladas. El tallo presentó el mayor peso de materia seca al final del desarrollo de las plantas, alcanzando un peso promedio de 1.8 toneladas por hectárea.

**Figura 4.6 Acumulación de materia seca en Ton/ha de Girasol variedad RIB 77**



**Figura 4.7 Acumulación de materia seca en Ton/ha de Girasol variedad KLM 123**



## **Discusión**

En general podemos observar que la biomasa aérea de las variedades de girasol bajo estudio siguen una cinética de crecimiento clásica, mostrando incrementos de peso de tallos aun en cosecha, lo que les hace presentar en este estadio para biomasa total aún en proceso de incremento.

Durante el proceso de acumulación de biomasa se lleva a cabo translocaciones y redistribuciones de fotosintatos, principalmente en la etapa de floración, en la cual se observan los movimientos de las hojas hacia los granos y así observamos:

- Que entre la variedad SAN-3C y la var. GORDIS, aún cuando la SAN-3C tiene mayor biomasa, en la var. GORDIS se presentan mayores translocaciones y removilizaciones de fotosintatos del tallo y las hojas al capítulo y grano esto durante el período fin de Floración.

- Por otra parte entre las variedades semienanas la SANE 1278 redistribuye y transloca de las hojas más fotosintatos en beneficio del capítulo más grano que la SANE 23578 en el estadio Fin de Floración.

- Finalmente la mayor biomasa reportada para la var. RIB 77 comparada con la var. KLM 123 es debido a que la RIB tiene tallos y hojas de mayor peso lo que le permite efectuar una mayor redistribución y translocación de fotosintatos al capítulo más grano.

## **4.5 Rendimiento de grano**

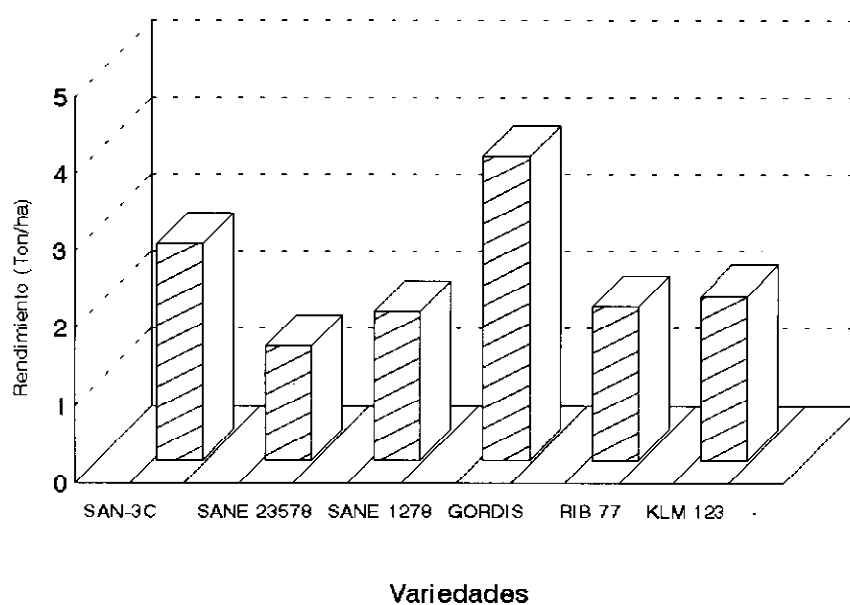
La figura 4.8 reporta los rendimientos de semilla obtenidos en las diferentes variedades bajo estudio.

La variedad GORDIS reporta el más alto rendimiento con 3.9 ton/ha seguida de la var. SAN-3C con 2.8 ton/ha, observándose un segundo grupo integrado por la KLM 123,

la RIB 77 y la SANE 1278 con rendimientos de 2.13, 1.99 y 1.92 ton/ha respectivamente. La variedad que reporta el rendimiento más bajo es la SANE 23578 con 1.48 ton/ha.

Lo anterior reafirma la discusión anterior en la cual se señala que la variedad GORDIS presenta una mayor cantidad de redistribuciones y translocaciones de fotosintatos en beneficio del grano.

**Figura 4.8 Rendimiento de la semilla en Ton/ha de Girasol en diferentes variedades**



#### 4.6 Índice de cosecha

El cuadro 4.5 muestra los valores de Índice de Cosecha (I.C.) obtenidos para las variedades.

Cuadro 4.5 Valores de Índice de Cosecha de las variedades de Girasol.

Variedad	Índice de Cosecha
SAN-3C	0.363
SANE 23578	0.305
SANE 1278	0.323
GORDIS	0.547
RIB 77	0.287
KLM 123	0.369

El valor de I.C. para la variedad GORDIS de la UAAAN sobrepasa en un 65% los reportes de Martínez (1987), asimismo la SAN-3C es más alta en un 10% aproximadamente que los del autor mencionado.

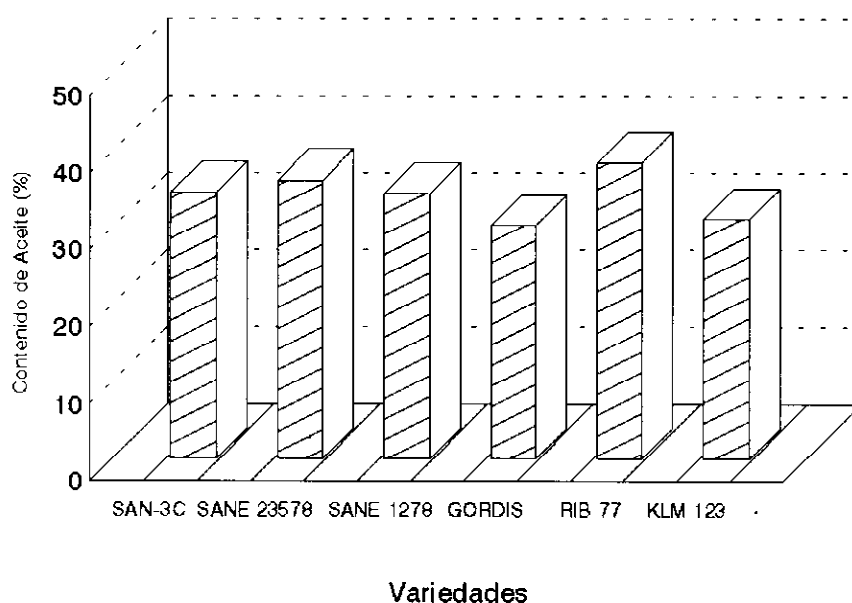
Barrón (1992) cita que la biomasa pesada a maduración y el incremento en la proporción del capítulo pueden ser recomendadas como una alternativa para incrementar el rendimiento de la semilla, la combinación de estas 2 características requieren la conservación de un alto índice de cosecha para incrementar el rendimiento. En nuestro estudio las variedades presentan índices de cosecha altos y aceptables para mejorar el rendimiento de las variedades.

#### 4.7 Contenido de Aceite (%)

La figura 4.9 nos muestra el contenido de aceite obtenido al analizar la semilla de las variedades. Podemos observar que no hubo diferencias entre las variedades. Pero si

analizamos los valores medios, la var. RIB 77 reporta el mayor porcentaje de aceite con 38.9% seguida de la SANE 23578 con 36.04% y a continuación con la var. SAN-3C y SANE 1278 con 34.39 y 34.22% respectivamente. Finalmente la variedad GORDIS muestra el contenido de aceite más bajo con 30.19%. Lo anterior podría atribuirse a que no hubo diferencias en las Unidades Calor acumuladas a los estadios fin de floración y madurez fisiológica.

**Figura 4.9 Contenido de Aceite (%) de las semillas de las variedades de girasol**

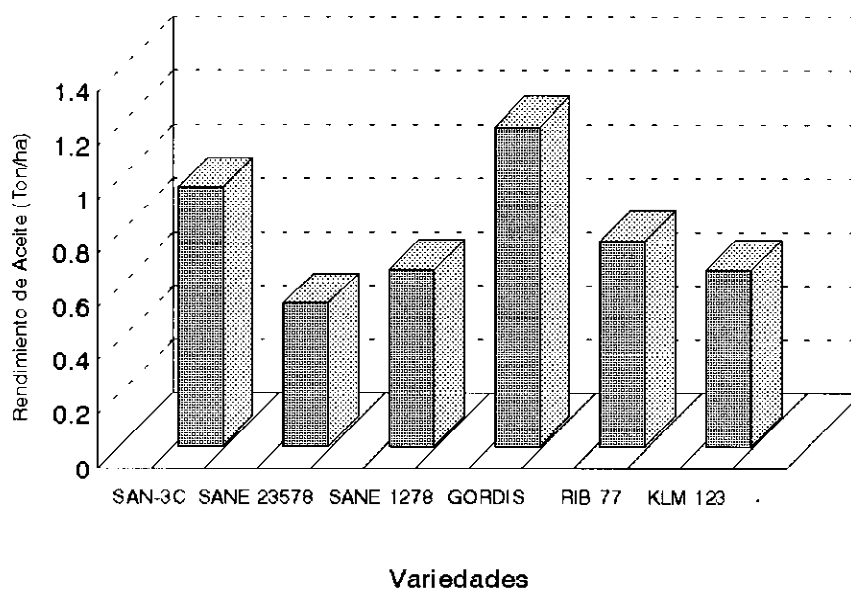


#### 4.8 Rendimiento de aceite

La figura 4.10 nos presenta el rendimiento de aceite (Ton/ha) de las variedades de girasol bajo estudio. Podemos observar que se presenta la misma tendencia que para rendimiento de grano, es decir que la variedad GORDIS produce el mayor rendimiento con 1.18 ton/ha seguida de la variedad SAN-3C con 0.96 ton/ha y continúan la RIB 77, la KLM 123 y la SANE 1278 con 0.76 ton/ha, y 0.658 ton/ha para la primera y las dos

ultimas respectivamente. La variedad menos rendidora fue la SANE 23578 con 0.533 ton/ha en el mismo lugar que ocupó para rendimiento de grano.

**Figura 4.10 Rendimiento de Aceite (Ton/ha) de las variedades de girasol**

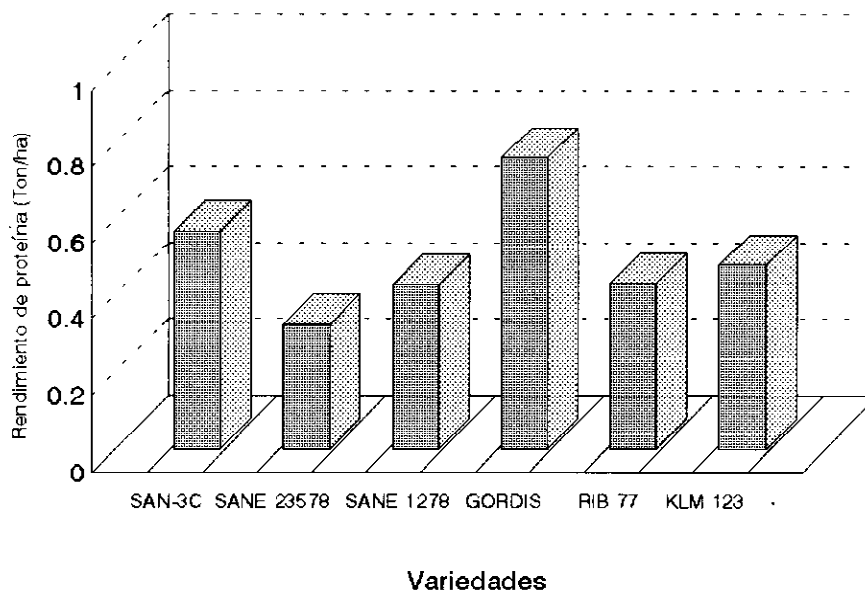


#### 4.9 Rendimiento de proteína cruda

La figura 4.11 nos presenta los resultados de proteína cruda en ton/ha, y podemos constatar que la tendencia es la misma que para rendimiento de grano y de aceite. La variedad GORDIS produce 0.76 ton/ha, la SAN-3C 0.57 ton/ha, seguida de la KLM 123, la RIB 77 y la SANE 1278 con rendimientos de 0.437 ton/ha y 0.43 ton/ha respectivamente y la menos rendidora nuevamente fue la SANE 23578 con 0.326 ton/ha.



**Figura 4.11 Rendimiento de proteína (Ton/ha) de las variedades de girasol**



**ANÁLISIS DE PROTEÍNAS SOLUBLES: FOLIARES Y DE LA SEMILLA DE GIRASOL.**

**ANÁLISIS DE ELECTROFORESIS DE LAS PROTEÍNAS SOLUBLES.**

#### **4.10 Proteínas solubles foliares**

A continuación se presentan los resultados cuantitativos de las proteínas solubles foliares y de la semilla durante el desarrollo del cultivo. (Figuras 4.12 y 4.13).

La variedad SAN-3C presenta un incremento continuo de proteína soluble foliar hasta Fin de Floración con 217.1 mg/grs de hojas/planta, es la variedad que presenta los mayores incrementos. Martínez (1987) con variedades francesas reporta incrementos en Fin de Floración con tendencias semejantes a las de la var. SAN-3C, pero con contenidos inferiores a esta.

La variedad SANE 1278 reporta variaciones de contenido de proteínas solubles que van de 47.61 mg/grs de hojas/planta en Estadio Estrella a 134.3 mg/grs de hojas/planta en Fin de Floración y en cosecha la semilla reportó 397.3 mg/grs de semillas/planta, lo que puede atribuirse este bajo contenido a que se trata de una variedad semienana con un área foliar menor a la de las otras variedades.

La variedad SANE 23578 reporta para proteínas solubles foliares contenidos que van de 33.17 mg/grs de hojas/planta en Estadio Estrella a 96.3 mg/grs de hojas/planta en Fin de Floración y en la semilla presenta 312.7 mg/grs de semilla/planta, lo que puede atribuirse al caso anteriormente señalado.

La variedad GORDIS presenta un contenido de proteínas solubles foliares que varían de 101.87 mg/grs de hojas/planta en Estadio Estrella a 92.74 mg/grs de hojas/planta en Fin de Floración y en la semilla presenta un contenido de 869 mg/grs de semilla/planta. Podemos explicar este comportamiento considerando que esta variedad reportó el 2° lugar en Area Foliar y en Biomasa y el primero en Rendimiento de grano, además de tener un Índice de Cosecha muy por encima del resto de las variedades de la UAAAN, testigos y de variedades francesas. Lo anterior nos indica que esta variedad realiza activamente removilizaciones de proteínas foliares en beneficio de la semilla.

Por lo que respecta a la variedad RIB 77 el contenido de proteínas solubles foliares varía de 70.06 mg/grs de hojas/planta en Estadio Estrella a 75.6 mg/grs de hojas/planta en Fin de Floración y en semilla tiene un contenido de 728.2 mg/grs de semilla/planta, lo anterior podría atribuirse a que presenta el Índice de area Foliar más alto y posiblemente las removilizaciones son fuertes en la etapa de fructificación.

En el caso de la variedad KLM 123 el contenido de proteínas solubles varían en el rango de 66.5 mg/grs de hojas/planta en el Estadio Estrella presentando en el Inicio de Floración 103.7 mg/grs de hojas/planta hasta 60.7 mg/grs de hojas/planta en Fin de

Floración, la semilla reporta 548.9 mg/grs de semilla/planta de proteína lo cual puede explicarse dado que el Area Foliar que reportó es de las más bajas así como la biomasa.

#### 4.11 Proteínas solubles de la semilla

La Figura 4.13 presenta los contenidos (mg/grs de semilla/planta) de proteínas solubles de las semillas de las variedades.

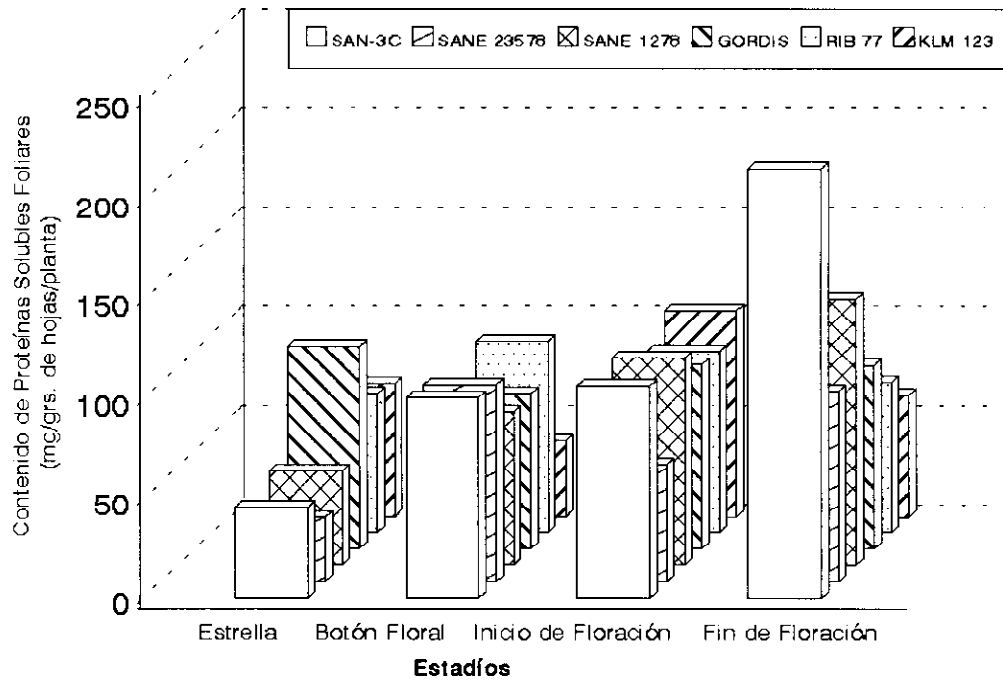
La variedad GORDIS reporta el mas alto contenido con 86.9 mg/grs de hojas/planta, seguida de la variedad SAN-3C con 75.9 mg/grs de hojas/planta, a continuación la variedad RIB 77 y KLM 123 con 72.82 y 54.9 mg/grs de hojas/planta, y finalmente las variedades semienanas SANE (1278 y 23578) con 39.7 y 31.3 mg/grs de hojas/planta. Nuestros resultados de proteínas solubles son superiores a los reportados por Martínez (1987) y Jiang *et al.* (1994).

Estos resultados nos muestran que el contenido de proteína soluble esta relacionado directamente con el rendimiento de grano, de aceite y de proteína cruda.

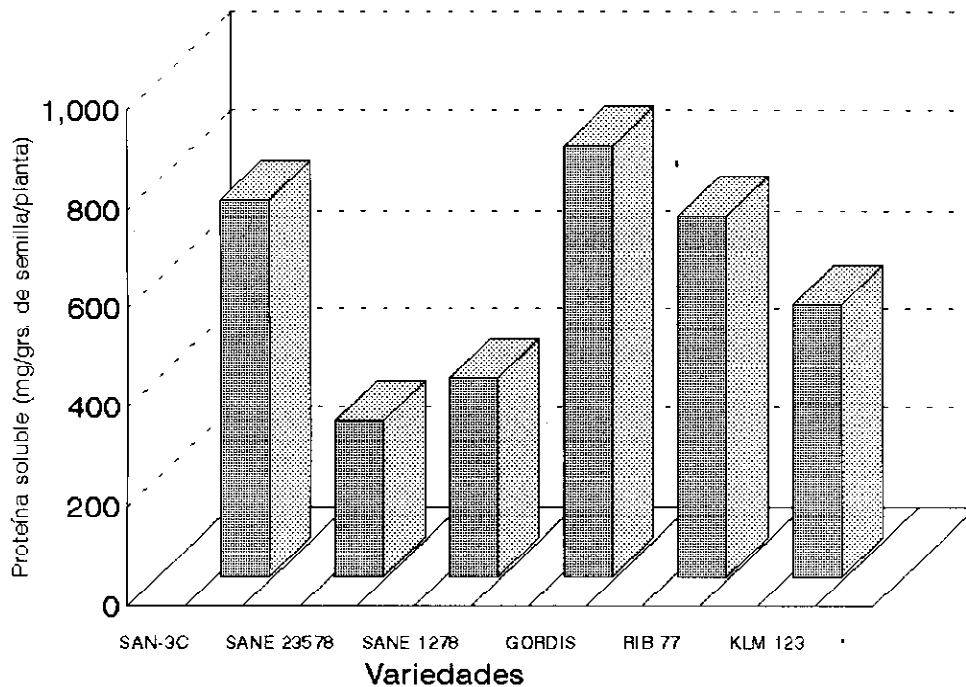
El Cuadro 1 del apéndice nos presenta los coeficientes de correlación de las variables de proteínas solubles en semilla que reporta correlaciones positivas y significativas al 5 % con: biomasa total en inicio de floración (0.8302); con biomasa total en madurez fisiológica (0.8485); con biomasa en cosecha (0.9099); y con rendimiento (0.8331), además el área foliar en madurez fisiológica con proteínas solubles en semilla se correlacionan positiva y significativamente con un coeficiente de 0.9371. Se presentan otros resultados de correlaciones con área foliar, con biomasa y rendimiento.

Lo anterior prueba la propuesta de nuestro primer objetivo de estudio.

**Figura 4.12 Contenido de proteínas solubles foliares (mg/grs de hojas/planta) de las variedades de girasol en diferentes estadios**



**Figura 4.13 Contenido de proteínas solubles (mg/grs de semilla/planta) de las semillas de girasol en diferentes variedades**



#### 4.12 Análisis de Electroforesis de las Proteínas

Las Figuras 4.14 a 4.18 presenta las fotografías de los estudios de electroforesis de las variedades en los diferentes estadios de desarrollo. Asimismo, los Cuadros de 2 al 6 de apendice nos reportan los pesos moleculares de las proteínas.

La Figura 4.14 nos muestra el estadio estrella en el cual las variedades reportan un número variable de proteínas que van 7 a 16, la proteína más grande reporta un peso molecular de 154.88 KDa. Para las variedades SAN-3C y KLM 123 se presentan polipéptidos comunes que son a: 109.6; 83.17; 54.95; 37.15 y 28.82. Nuestros resultados coinciden con los de Jiang *et al.* (1994), para las proteínas de 95, 66, 57, 49 y 28 KDa, además coinciden con los de Anisimova (1992), el cual reporta tres grupos principales de polipéptidos: los básicos de masas moleculares de aproximadamente 20 KDa y dos grupos de polipéptidos ácidos de 30 y 40 KDa y señala que la composición de estos polipéptidos fué altamente variable.

La Figura 4.15 del Estadio Boton Floral, las proteínas de las variedades presentan un número variable de 8 a 15 y el peso molecular más alto fue de 141.25 KDa, se presentan proteínas comunes para las variedades que son: 109.68; 69.18; 61.65; 44.68 y 39.81. Los polipéptidos con mayor expresión fueron: 79.43 y 28.84 KDa, los cuales no se apreciaron en la variedad KLM 123. La variedad GORDIS presenta un mayor número de proteínas y la de menor número fue la KLM 123. De acuerdo con Jaing (1994) y Anisimova (1992) tenemos también en nuestro estudio polipéptidos de 95.5; 57.5; 44.6; 39.8 y 28.8.

La Figura 4.16 en Estadio Inicio de Floración presenta para las variedades un número de proteínas que van de 9 a 14. Las comunes a todas son cuatro a: 123.01; 104.71; 39.81 y 28.84 KDa. La proteína de mayor peso molecular fue la de 147.91 KDa. La proteína que tuvo mayor expresión fue la de 74 KDa que no se presento en las variedades SANE 23578 y KLM 123. Las que coincidieron con lo reportado por Jiang (1994) y Anisimova (1992) son las proteínas de pesos moléculres de 97.7; 52.2; 45.7; 39.8 y 28.8.

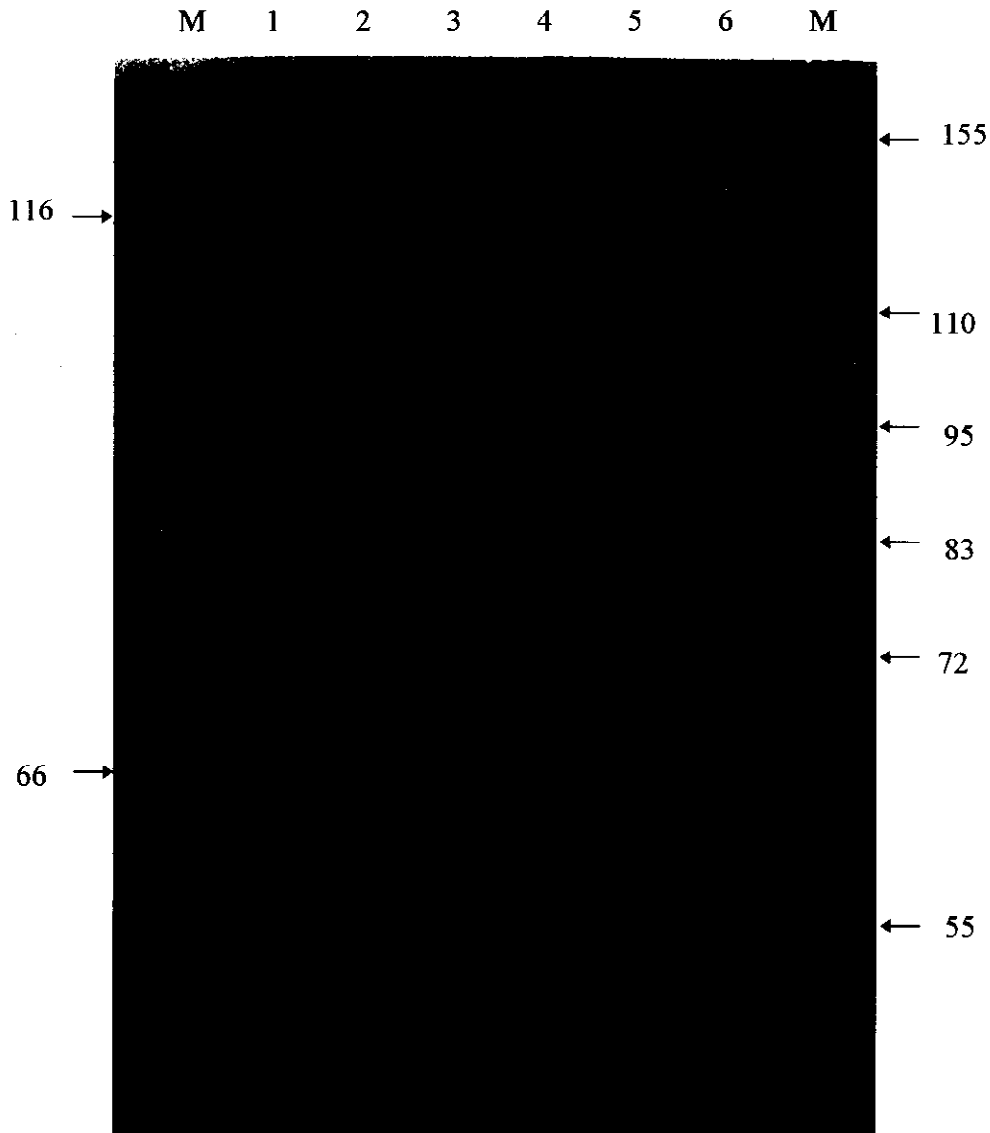


Figura 4.14 Comparación de polipéptidos de proteínas solubles foliares de seis variedades de girasol, que fueron separadas por análisis en gel desnaturizante. Las muestras analizadas fueron extraídas de hojas colectadas en el Estadio Estrella. Los pesos moleculares en kilodaltons se determinaron con los marcadores ( $\mu$ ) estándar de proteínas que están en los extremos de las proteínas de las variedades analizadas. Estas variedades son: 1) SAN 3C, 2) SANE 23578, 3) SANE 1278, 4) GORDIS, 5) RIB 77 y 6) KLM 123.

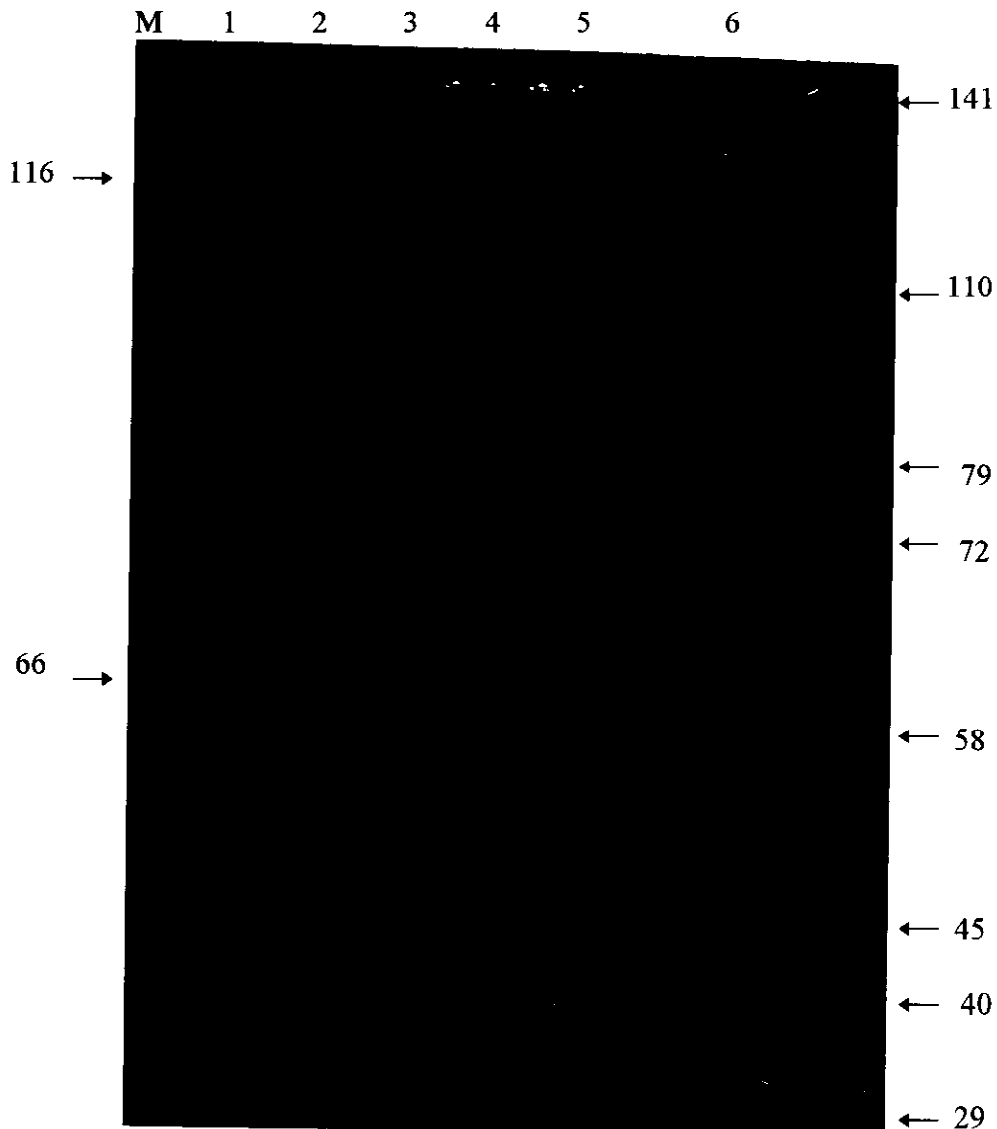


Figura 4.15 Separación de proteínas solubles por Gel Poliacrilamida de Electroforesis en condiciones desnaturalizantes. El gel fue teñido con Azul Brillante de Coomassie. Las muestras de proteínas fueron extraídas de hojas de seis variedades de girasol colectadas en el estadio de Botón Floral. Las variedades analizadas son: 1) SAN 3C, 2) SANE 23578, 3) SANE 1278, 4) GORDIS, 5) RIB 77 y 6) KLM 123. Los pesos moleculares en kilodaltons (KDa) se determinaron con los marcadores estándar de proteínas (M).

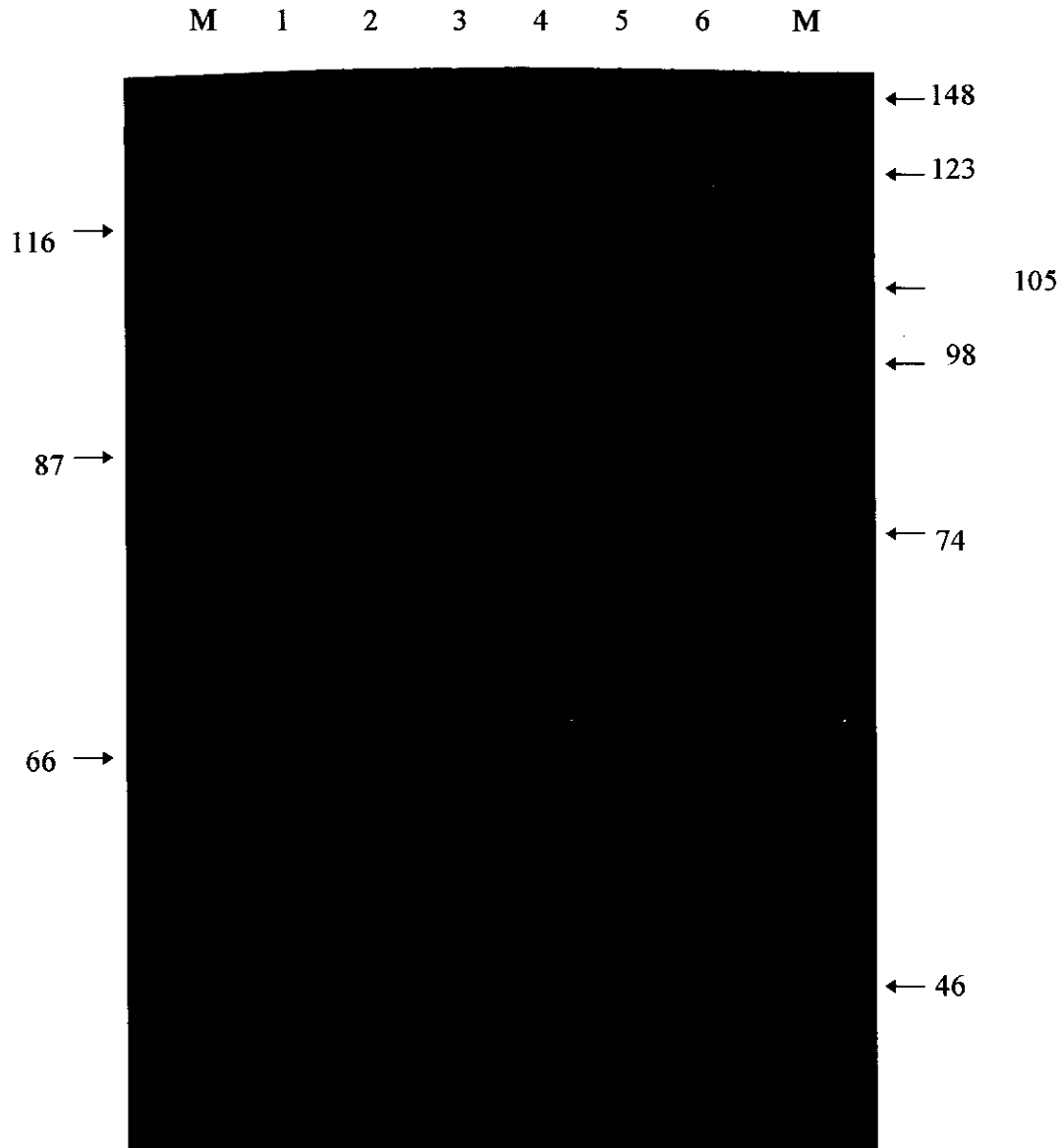


Figura 4.16 Separación de proteínas extraídas de hojas de seis variedades de girasol colectadas al Inicio de Floración, la separación se hizo en SDS-PAGE, 100 microgramos de proteína fueron analizados. El peso molecular de las proteínas está dado en kDa, y fue determinado con los marcadores ( $\mu$ ) estándar que se encuentran en los extremos de las proteínas analizadas. Las variedades analizadas son: 1) SAN 3C, 2) SANE 23578, 3) SANE 1278, 4) GORDIS, 5) RIB 77 y 6) KLM 123.



La Figura 4.17 del Estadío Fin de Floración presenta para las variedades proteínas que van de 8 a 12 por variedad, las proteínas comunes son las de pesos moleculares: 147.9; 123.02; 104.71 y 43.65. Las proteínas que coinciden con las reportadas por Jaing (1994) y Anisimova (1992) son las de masa molecular de 95.5; 58.8; 54.9 y 43.6. Podemos observar que el número de proteínas comunes en este estadío y en el de Inicio de Floración disminuye a cuatro.

En la Figura 4.18 se presentan las bandas de polipéptidos de las proteínas solubles de la semilla de las variedades de girasol.

Podemos observar que las proteínas de pesos moleculares bajos están presentes con mayor expresión en: 58, 45, 37 y 28 KDa; las proteínas comunes son solo tres de masa molecular: 87.09; 57.524 y 44.66 KDa, el mayor peso reportado es de la proteína de 138.03 KDa y los polipéptidos varían de 6 a 10. La coincidencia con Jaing (1994) y Anisimova (1992) es con las proteínas de peso molecular de 57.5; 54.9; 37.1; 28.8 y 26.9 KDa.

De los resultados presentados anteriormente podemos constatar que tenemos patrones de polipéptidos para las proteínas solubles de la semilla de la variedad GORDIS que fue la más rendidora, así como de la SAN-3C, de las semienanas y de las testigo.

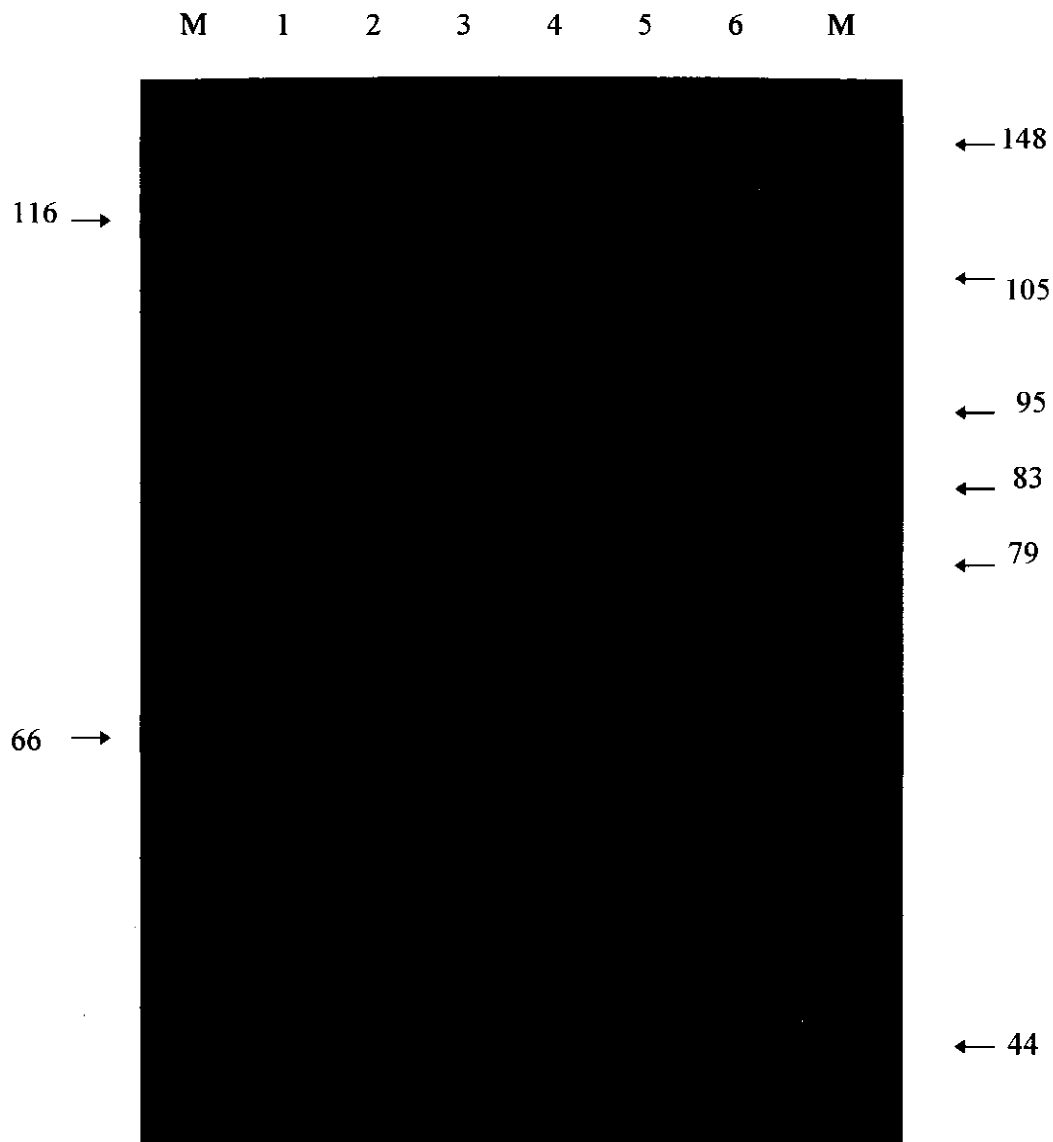


Figura 4.17 Comparación de polipéptidos de proteínas solubles extraídas de hojas de seis variedades de girasol en el estadio de Fin de Floración. Las proteínas fueron separadas por análisis de electroforesis en condiciones desnaturizantes. Las bandas de proteínas que aparecieron en el análisis, fueron teñidas con Azul Brillante de Coomassie. Las variedades analizadas fueron: 1) SAN 3C, 2) SANE 23578, 3) SANE 1278, 4) GORDIS, 5) RIB 77 y 6) KLM 123. El peso molecular en KDa de las proteínas que fueron identificadas, se determinó con marcadores estándar de proteínas ( M ).

KDa = Kilodaltons

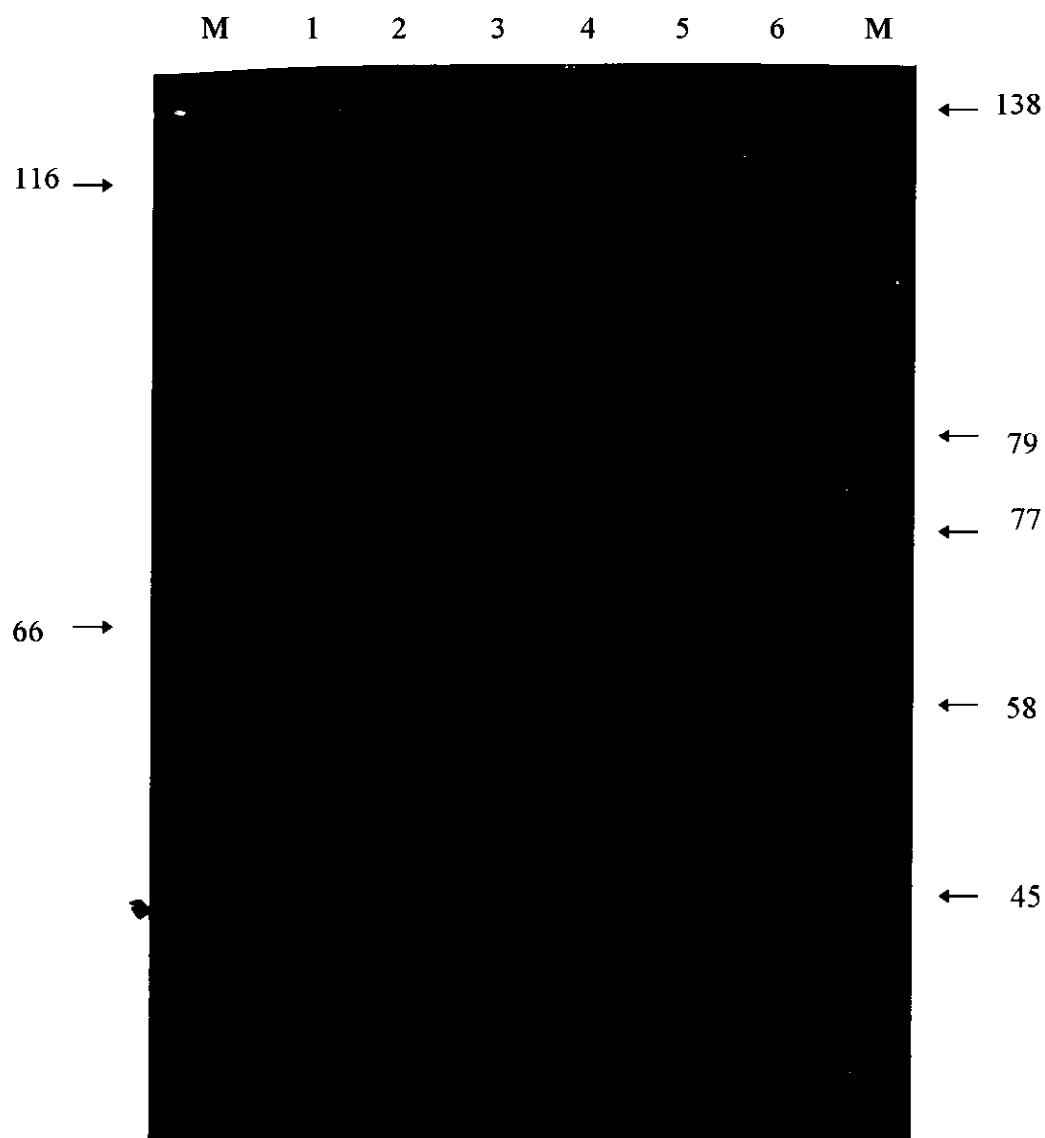


Figura 4.18 Separación de proteínas solubles de semillas de girasol por análisis de electroforesis en gel desnaturalizante. Las muestras de proteínas fueron extraídas de semillas colectadas al término del desarrollo del cultivo, en la Cosecha. Las proteínas que se presentaron en el gel fueron teñidas con Azul Brillante de Coomassie. Las variedades estudiadas fueron: 1) SAN 3C, 2) SANE 23578, 3) SANE 1278, 4) GORDIS, 5) RIB 77 y 6) KLM 123. Para determinar el peso molecular de cada una de las proteínas se utilizaron marcadores estándar (M).  
KDa = Kilodaltons

## **V. CONCLUSIONES**

1. Existe relación entre los parámetros de producción (rendimiento de grano, de aceite y de proteína cruda) con las proteínas solubles de la semilla.
2. Las variedades GORDIS y SAN-3C mejoradas en la UAAAN son las más sobresalientes en contenido de proteínas solubles de la semilla, así como en los parámetros de producción señalados en 1, superando a los testigos.
3. Las proteínas solubles de las semillas son un patrón de rendimiento de las variedades de girasol estudiadas.
4. Los patrones de proteína de las variedades GORDIS y SAN-3C están compuestas de 8 y 6 polipéptidos.
5. Las proteínas están involucradas en el proceso de metabolismo de la síntesis de ácidos grasos del aceite de girasol.

## **RECOMENDACIONES**

NUESTROS RESULTADOS SON LA BASE PARA CONTINUAR LOS ESTUDIOS DE LA BIOSÍNTESIS DE ACUMULACIÓN DE ACEITE Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR, POR LO QUE ES IMPORTANTE CONTINUAR CON INVESTIGACIONES SOBRE ESTA LÍNEA.

## VI. RESUMEN

El girasol es una planta oleoproteagínosa que se caracteriza por una fotosíntesis alta. El sistema enzimático del girasol es el de una planta C<sub>3</sub>, la asimilación de CO<sub>2</sub> se efectúa gracias a la enzima RUBISCO, esta enzima es la más abundante de las proteínas solubles de las hojas y tiene también un rol catalítico fundamental y además se añade necesariamente un rol de reserva porque a la senescencia de las hojas, una parte de su carbono y sobre todo del nitrógeno es liberado y puesto a disposición de los órganos de reserva que son en este caso las semillas.

La acumulación de compuestos nitrogenados tiene lugar esencialmente durante la fase vegetativa, después de la floración el almacenamiento total de nitrógeno varía poco, se observan principalmente redistribuciones.

Debido a las reacciones de las proteínas con el proceso de fotosíntesis es posible considerar que una variedad con alto contenido de proteína soluble proporcionará mayor rendimiento, ya que las proteínas están relacionadas con el proceso de metabolismo y acumulación de biomasa, asimismo participan en la regulación de la síntesis de aceite.

Por lo anterior en nuestra investigación hemos realizado estudios agronómicos y bioquímicos con los objetivos de relacionar los parámetros de producción con el contenido de proteínas solubles, y caracterizar los patrones de proteínas solubles por electroforesis.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el campo experimental de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", ubicada en Buenavista, Municipio de Saltillo Coahuila. Se sembraron seis genotipos de girasol (*Helianthus annuus* L.), cuatro de ellos son producto de las investigaciones del Departamento de Fitomejoramiento de la

UAAAN, y los otros dos genotipos son variedades comerciales de origen Argentino. La siembra se realizó el día 10 de junio de 1996, bajo un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones. Se realizaron labores de: fertilización, aclareo, deshierbe, control de plagas y enfermedades, cubrimiento de capítulos y se aplicaron dos riegos a los dos y ocho días después de la siembra.

Las variables monitoreadas fueron: peso seco por órganos, área foliar, rendimiento de semilla, contenido de aceite de la semilla, contenido de proteína soluble (Técnica de Bio Rad, 1997) y peso molecular de las proteínas solubles (Laemmli, 1970).

Los resultados obtenidos muestran que las variedades presentaron en el estadio inicio de floración la mayor superficie foliar, siendo la más alta la RIB 77, seguida de la SAN-3C y de la GORDIS y las variedades KLM 123 y SANE (1278 y 23578) reportaron la superficie foliar más baja.

En producción de materia seca la variedad SAN-3C acumuló mayor biomasa con un total de 7.6 ton/ha en cosecha, seguida de la GORDIS con 7.18 ton/ha, seguidas de la RIB 77, la SANE 1278 y la KLM 123 con 6.91, 5.94, y 5.76 ton/ha respectivamente, finalmente la que reportó menor biomasa fue la SANE 23578 con 4.85 ton/ha,

El rendimiento de semilla reporta a las variedades GORDIS y SAN-3C con 3.9 y 2.8 ton/ha respectivamente seguidas de la KLM 123, la RIB 77 y la SANE 1278 con rendimientos de 2.13, 1.99 y 1.92 ton/ha respectivamente, la variedad que reportó el rendimiento más bajo fue la SANE 23578 con 1.5 ton/ha. Referente a los índices de cosecha la variedad GORDIS fue sobresaliente con 0.547, seguida de la KLM 123 (0.396), SAN-3C (0.363), SANE 1278 (0.323), SANE 23578 (0.305) y la RIB 77 (0.287). En rendimiento de aceite y proteína cruda las variedades mantienen la misma tendencia que para rendimiento de grano.

Las proteínas solubles foliares reportaron que la variedad SAN-3C tuvo un marcado incremento hasta el estadio fin de floración, esta tendencia la presenta también la SANE 1278. En general las proteínas solubles foliares variaron en rangos de 33.17 a 217.1 mg/grs de hojas/planta. Las proteínas solubles de las semillas variaron de 313 a 869 mg/grs de semilla/planta manteniéndose entre variedades la misma tendencia que se presento para rendimiento de semilla. Los estudios de electroforesis de las proteínas de los diferentes estadios mostraron la presencia de polipéptidos en un rango variable de pesos moleculares, y coincidiendo con los resultados de Jiang *et al.* (1994) y de Anisimova (1992).

Podemos concluir que: existe relación entre los parámetros de producción (rendimiento de grano, de aceite y de proteína cruda) con las proteínas solubles de la semilla; las variedades GORDIS y SAN-3C mejoradas en la UAAAN son las más sobresalientes en contenido de proteínas solubles de la semilla, así como en los parámetros de producción, superando a los testigos; las proteínas solubles de las semillas son un patrón de rendimiento de las variedades de girasol estudiadas; los patrones de proteínas de las variedades GORDIS y SAN-3C están compuestas de ocho a seis polipéptidos; por lo anterior consideramos que las proteínas estan involucradas en el proceso de metabolismo de la síntesis de ácidos grasos del aceite de girasol.

Nuestros resultados son la base para continuar los estudios de la biosíntesis de acumulación de aceite y de la biología molecular, por lo que es importante realizar más investigaciones sobre esta línea.

## VII BIBLIOGRAFIA

- Anisimova, I.N. 1992. Sunflower Seed 11s Globulin (*Helianthinin*) as Genetic Marker. In Proc. of the 13<sup>th</sup> Intl. Sunflower Conf. Pisa Italy. 7-11 September Vol. 1, p501-512
- Barrón J.E. 1992. A factor analysis of plant variables related to yield in sunflower water stress conditions. In Proceeding of the 13<sup>th</sup> International Sunflower Conference. Pisa, Italy. 7-11 September. Vol 1 p. 531-538.
- Bio Rad. 1997. Técnica de determinación de proteínas solubles. Catalogo Bio Rad.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Cabrera, M. y J.J. San José. 1987. Bioproduction and Leaf Area Development in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). I. Quantitative Relationship in a Savanna Wet Season. Turrialba. Vol 37, No. 1, p. 9-15.
- Canvin, D. T. 1965. The effect of Temperature on the Oil Content and Fatty Acid Composition of the Oils from Several Oil Seed Crops. Canadian journal of Botany. Vol. 43, pp 63-69.
- Carter, J.F. 1978. Sunflower Science and Technology. Editorial Committee. Wisconsin, U.S.A. pp 422-427.
- C.E.T.I.O.M - AFNOR. 1986. L'Analyse des graines oleagineuses. Ed. CETIOM. Paris, Francia.
- Cisneros L., G. 1994. Distribución de Materia Seca y Nitrógeno en Girasol (*Helianthus annuus* L.) Bajo Condiciones de Invernadero. Tesis Profesional, UAAAN.
- Conn y Stumpf. 1986. Bioquímica Fundamental. Tercera edición, Editorial Limusa. México.
- D'Andria, R. *et al.* (1995). Yield and Soil Water Uptake of Sunflower Sown in Spring and Summer. Agronomy Journal. Vol. 87. pp 1122-1128.



- Fick, G. N., D. E. Zimmer, and D.C. Zimmerman. 1974. Correlation of Seed Oil Content in Sunflowers with Other Plant and Seed Characteristics. *Crop Science*, Vol. 14, pp. 755-757.
- Geoffrea W. H. Potter. 1995. *Analysis of Biological Molecules*. CHAPMAN & HALL. Great Britain . pp 163-175.
- Godon, B. 1985. *Protéines végétales*. Editor. Technique et Documentation (Lavoisier). Paris, Francia. P. 626
- Goyne, P.J. and A. A. schneiter. 1987. Photoperiod Influence on Development in Sunflower Genotypes. *Agronomy Journal*. Vol. 79, pp 701-709.
- Guerrero G., A. 1977. El girasol. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 98-109. *Turrialba* Vol. 37, No. 1, pp 9-15.
- Jaafar, M. N., L. R. Stone and D. E. Goodrum. 1993. Rooting depth and Dry Matter Development of Sunflower. *Agonomy Journal*. Vol. 85:281-286.
- Jiang, L.W. *et al.* 1994. Identification of Peroxisome Membrane Proteins (PMPs) in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Cotyledons and Influence of Light on the PMP Developmental Pattern. *Plant Physiol*. 106:293-302.
- Johnson, B. J. And M. D. Jellum. 1972. Effect of Planting Date on Sunflower Yield, Oil, and Plant Characteristics. *Agronomy Journal*. Vol. 64, pp 748 y 749.
- Jung, Jean-Luc, B. Fritig and H. Günther. 1993. Sunflower (*Helianthus annuus* L) Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiol*. Vol.101:873-880.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Livera , H.A. y A. C. Carballo. Respuesta del Rendimiento y la Calidad de Semillas de girasol al Fertilizante y la Densidad de Población. pp 323-332.
- Martínez B.E. 1987. Production de quelques especes cultivees: Influence de diferentes coditions. Thèse Doctoral. Université Paul Sabatier Toulouse. Francia.
- Merrien , A., A. Quinsac y C. Maisonnevus. 1988. Variabilité de la Teneur en Proteines des Graines de Tournesol en Relation avec L'état Protéique Foliaire. Proc 12<sup>th</sup> Intern. Sunf. Conf. Novi-sad. Yugoslavia. I. pp 158-169.
- Merrien A. 1992. Some aspects of Sunflower crop physiology. In *Proceeding of*

the 13th International Sunflower Conference. Pisa, Italy. 7-11. September.  
Vol. 1. pp.481-498

Olivares S., J.R. 1995. Estudio de la Eficiencia de Producción y Calidad de 5 Variedades de girasol ( *Helianthus annuus* L. ). Tesis profesional, UAAAN.

Ortegón M., A.S. 1993. El Girasol. Editorial Trillas, México. p. 15-54.

Pawtowski, S. H. 1964. Seed Genotype and Oil Percentage Relationship Between Seed of a Sunflower. Can. J. Genet. Cytol. Vol. 6, pp 293- 297.

Rabilloud, T. 1996. Solubilization of Proteins for Electroforesis Analyses. Electroforesis, Vol. 17, pp 813-829.

Robinson, R. G. 1978. Sunflower Date of planting and Chemical Composition of Various Growth Stages. Agronomy Journal. Vol. d12, pp 665 y 666.

Robles S., R. 1985. Producción de Oleaginosas y Textiles. Segunda Edición. De. Limusa. México. p. 431-498.

Sambrook, J., E.F, Frittsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Second Edition (Tomo 3). Cold Spring Harbar Laboratory Press. USA. 18:48-18:57.

San José, J.J. y M. Cabrera. 1988. Bioproduction and Leaf Area Development (*Helianthus annuus* L.). II. Quantitative Relationship in a Savanna Dry Season. Turrialba Vol. 38 No.3 pp 179-184.

Saumell, H. 1976. El Girasol. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires Argentina. 130 p.

Tocagni, H. 1980. El Girasol. Editorial Albatros, Buenos Aires, Argentina. 102 p.

Tsugita, A. 1996. Two-dimensional electroforesis of plant protein and standarization of gel patterns. Electroforesis. Vol. 17, pp 855-865.

**VII. APENDICE**

**Cuadro 1 Correlaciones de los parámetros evaluados en Girasol.**

<b>VARIABLE</b>	<b>COEFICIENTE DE CORRELACION</b>
Proteínas solubles en semilla con biomasa total en I.F.	0.8302 *
Proteínas solubles en semilla con biomasa total en M.F.	0.8485 *
Proteínas solubles en semilla con biomasa total en Cosecha	0.9099 *
Proteínas solubles en semilla con rendimiento de semilla	0.8331 *
Área foliar en M.F. con proteínas solubles en semilla	0.9371 * *
Área foliar en M.F. con biomasa total en fin de floración	0.8115 *
Área foliar en M.F. con biomasa total en cosecha	0.8481 *
Área foliar en M.F. con rendimiento de semilla	0.8390 *

**Cuadro 2 Pesos moléculares de las proteínas solubles foliares ( KDa ) de girasol en el Estadio Estrella.**

SAN 3-C	SANE 23578	SANE 1278	GORDIS	RIB 77	KLM 123
154.881					154.881
	134.896	134.896			
	123.026	123.026	123.026		
	114.815				
109.648	109.648	109.648	109.648	109.648	109.648
	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5
8.1763	83.176	83.176	83.176	83.176	83.176
				75.857	75.857
	72.443	72.443	72.443		
				69.183	
64.565	64.565	64.565	64.565	64.565	64.565
	61.659				
	57.544	57.544	57.544	57.544	57.544
54.954	54.954	54.954	54.954	54.954	54.954
	51.286	51.286	51.286		51.286
	48.977			48.977	48.977
	44.668		44.668		
37.153	37.153	37.153	37.153	37.153	37.153
28.825	28.825	28.825	28.825	28.825	28.825
T.B. 7	16	12	12	11	12

T.B. = Total de Bandas

 Proteínas comunes para todas las variedades

**Cuadro 3 Pesos moléculares de las proteínas solubles foliares (KDa) de girasol en el Estado de Botón Floral.**

SAN 3-C	SANE 23578	SANE 1278	GORDIS	RIB 77	KLM 123
141.253	141.253		141.253		
			128.825	128.825	
109.648	109.648	109.648	109.648	109.648	109.648
	97.723		97.723		100
			95.5	95.5	
91.2			93.325		
		89.125		89.125	
83.176	83.176		83.176		83.176
		81.283		81.283	
79.433	79.433		79.433	77.433	
72.443	72.443		72.443		72.443
69.183	69.183	69.183	69.183	69.183	69.183
61.659	61.659	61.659	61.659	61.659	61.659
57.544	57.544	57.544	57.544	57.544	
54.954	54.954				
44.668	44.668	44.668	44.668	44.668	44.668
39.811	39.811	39.811	39.811	39.811	39.811
28.84	28.84	28.84	28.84	28.84	28.84
T.B. 13	13	9	15	12	8


T.B. = Total de Bandas

 Proteínas comunes para todas las variedades

**Cuadro 4** Peso moléculas de las proteínas solubles foliares (KDa) de girasol en el Estadio de Inicio de Floración.

SAN 3-C	SANE 23578	SANE 1278	GORDIS	RIB 77	KLM 123
147.91		147.91	147.91	147.91	147.91
134.89		134.89	134.89	134.89	
123.026	123.026	123.026	123.026	123.026	123.026
114.815	114.815	114.815	114.815	114.815	
104.712	104.712	104.712	104.712	104.712	104.712
97.723		97.723	97.723	97.723	97.723
87.095	87.095	87.095		87.095	87.095
	81.283				81.283
74.131		74.131	74.131	74.131	
66.069	69.183				66.069
64.565		64.565	64.565	64.565	
61.659		61.659		61.659	
		56.234		56.234	
45.708	45.708	45.708			
39.811	39.811	39.811	39.811	39.811	39.811
28.84	28.84	28.84	28.84	28.84	28.84
T. B. 14	9	14	10	13	9


T.B. = Total de Bandas

 Proteínas comunes para todas las variedades

**Cuadro 5 Pesos moléculares de proteínas solubles foliares (KDa) en girasol en el Estadio Fin de Floración.**

SAN 3-C	SANE 23578	SANE 1278	GORDIS	RIB 77	KLM 123
147.91	147.91	147.91	147.91	147.91	147.91
	138.038				
			134.89	134.89	134.89
123.026	123.026	123.026	123.026	123.026	123.026
	114.815	114.815	114.815	114.815	114.815
104.712	104.712	104.712	104.712	104.712	104.712
97.723	97.723	97.723			
			95,5	95,5	95,5
	89.125				
			83.176	83.176	83.176
79.433	79.433				
		77.624			
			72.443	72.443	
66.069		66.069	66.069		
	64.565				
				61.659	
58.884				57.544	
	54.954	54.954		54.954	54.954
43.651	43.651	43.651	43.651	43.651	43.651
T.B. 8	8	9	10	12	9

T.B. = Total de Bandas


 Proteínas comunes para todas las variedades



**Cuadro 6 Pesos moléculares de proteínas solubles (KDa) de las semillas de girasol en Cosecha.**

SAN 3-C	SANE 23578	SANE 1278	GORDIS	RIB 77	KLM 123
138.038	138.038	138.038	138.038	138.038	
87.096	87.096	87.096	87.096	87.096	87.096
	79.433	79.433	79.433		
77.624					77.624
57.544	57.544	57.544	57.544	57.544	57.544
	54.954	54.954	54.954	54.954	54.954
44.668	44.668	44.668	44.668	44.668	44.668
		37.153	37.153	37.153	
28.84					
		26.915	26.915	26.915	26.915
T.B. 6	6	8	8	7	6

T.B. = Total de Bandas

 Proteínas comunes para todas las variedades